

**Über ein neues antiphlogistisches Wirkprinzip aus
Sabal serrulata ROEM. et SCHULT.**

Hartmut Flachsbarth

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551922_0046

Über ein neues antiphlogistisches Wirkprinzip aus

Sabal serrulata ROEM. et SCHULT.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Hartmut Flachsbarth

aus

München

Januar

1979



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 28.2.1979

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

für Ulli

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München angefertigt. Für die Hilfe, die mir bei der Durchführung der Arbeit zuteil wurde, möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen:

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. W a g n e r für die Anregung zu dieser Arbeit und für deren großzügige Förderung.

Herrn Professor Dr. G. Vogel und Frau Dr. M. Rothkopf, Fa. Dr. Madaus, Köln-Merheim, für die Durchführung der pharmakologischen Teste, wertvolle Diskussionen und Hinweise.

Herrn Dr. G. Wegener, Institut für Holzforschung der Universität München, für die Aufnahme der Zuckerchromatogramme.

Frau Magos, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die Aminosäureanalysen und schließlich den vielen nicht genannten Kollegen, die mir in verschiedenster Weise behilflich waren.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Bisherige Untersuchungen der Sabal-Droge	2
1.0 Vorkommen und botanische Beschreibung von Sabal serrulata	2
2.0 Chemie der bisher bekannten Inhaltsstoffe . .	3
3.0 Pharmakologie	5
3.1 Verwendung in der Volksmedizin	5
3.2 Bisherige pharmakologische Untersuchungen . .	5
B. Problemstellung	7
C. Eigene chemische Voruntersuchungen	8
D. 1.0 Herstellung und Untersuchung pharmakologisch wirksamer Fraktionen	13
2.0 Weg II: Verbesselter Isolierungsweg im Großansatz	21
2.1 Weg IIb: Gelchromatographie	26
2.2 Pharmakologische Testung	29
2.3 Analytik	30
2.4 Prüfung auf Wirkungssteigerung durch künst- liche Kontaminierung	39
2.5 Ergebnis des Isolierungswegs II	40
3.0 Abtrennung der Proteinfraktion (Isolierungs- weg III)	40
4.0 Erneute Diafiltration (Isolierungsweg IV) . .	48
4.1 Übersicht über die Dosis-Wirkungs-Beziehung pharmakologisch signifikant wirksamer Sabal- fraktionen	51
4.2 Analyse der BMÜ-S-Fraktion (Schalen-Fraktion)	52
4.3 Analyse der BMÜ-K-Fraktion (Kernfraktion) . .	59
5.0 Zusammenfassung und Vergleich der analytischen Daten	68

	Seite
E. Pharmakologie, allgemein	71
1.0 Die Pathophysiologie der Entzündung	71
2.0 Substanzen, die den Verlauf der Entzündung beeinflussen	75
3.0 Antiphlogistisch wirksame Pflanzen	76
F. Pharmakologie, speziell	80
1.0 Abgrenzung des wirksamen Prinzips aus <i>Sabal serrulata</i> gegenüber Proteinaseinhibitoren. . .	80
2.0 Beschreibung und Ergebnisse der durchgeführten pharmakologischen Tests	81
2.1 Prüfung auf antiexsudative Wirkung	82
2.2 Prüfung auf antiproliferative Wirkung	94
2.3 Pharmakologische Untersuchung anderer Poly- saccharide	95
3.0 Diskussion der Ergebnisse	96
Z U S A M M E N F A S S U N G	100
E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	102
1.0 Herkunft der Droge	102
2.0 Isolierungsmethoden	102
2.1 Drogenextraktion	102
2.2 Methanolfällung	102
2.3 Dialyse	103
2.4 Diafiltration	103
2.5 Gelchromatographie	104
2.6 Abtrennung des Proteinanteils durch enzymati- sche Verdauung	106
3.0 Analytik	106
3.1 Mikroanalysen, Spektralanalysen	106
3.2 Veraschungen	107
3.3 Flammenphotometrie	107
3.4 Komplexometrische Titrationsen	107
3.5 Phosphorbestimmungen	107
3.6 Uronsäurebestimmungen (nach BITTER und MUIR) .	108
3.7 Proteinbestimmung nach LOWRY	109

3.8	Isoelektrische Fokussierung, Proteinfärbung .	110
3.9	Berechnung des Molekulargewichtes der Protein- fraktion aus Sabalkernen	111
3.10	Aminosäureanalysen	112
3.11	Citrat-Bestimmung	112
3.12	Neutralzuckeranalysen	113
4.0	Trypsin-Inhibitor-Test	113
5.0	Pharmakologische Teste	115
5.1	Viscarin-Carrageenin-Ödem	116
5.2	Stauungsödem	116
5.3	Kunststoffpellet-Test	116
5.4	Granulombeutel-Test	117
5.5	Zusammenfassung der pharmakologischen Daten der wichtigsten getesteten Sabalfractionen . .	118
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		119

E I N L E I T U N G

Die medikamentöse Therapie entzündlicher Prozesse und rheumatischer Erkrankungen ist trotz bedeutender Fortschritte, die in den letzten 20 Jahren erzielt wurden, noch unbefriedigend. Der Erfolg der gebräuchlichen Arzneimittel, von denen die Corticosteroide unbestritten an der Spitze stehen, wird durch z.T. erhebliche Nebenwirkungen beeinträchtigt.

Die Suche nach neuen Antiphlogistika mit größerer therapeutischer Breite hält daher unvermindert an.

Wenn man von Aescin und Glyzyrrhizin absieht, so spielten bisher pflanzliche Präparate oder Inhaltsstoffe in der Therapie nur eine geringe Rolle. Die Gründe hierfür liegen darin, daß ihre Wirkungen nicht besonders ausgeprägt und die Wirkprinzipien weitgehend unbekannt sind.

Da es in der Volksmedizin eine Vielzahl von Pflanzen gibt, die mit dieser Indikationsstellung seit Jahrhunderten in Gebrauch sind, wurde in einem orientierenden pharmakologischen Screening versucht, die Drogen mit besonders guter antiphlogistischer Wirksamkeit für eine chemische Bearbeitung auszusondern.

In diesem Screening zeigten Fraktionen aus dem Fruchtextrakt der Zwergpalme Sabal serrulata eine auffallend hohe Wirksamkeit. Präparate aus dieser Droge wurden bisher zumeist in Kombination mit anderen Drogen zu Behandlungen von Entzündungen, vor allem der Prostata, verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Wirkprinzip zu lokalisieren und wenn möglich aufzuklären.

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Bisherige Untersuchungen der Sabal-Droge

1.0 Vorkommen und botanische Beschreibung von Sabal serrulata

Die Säge- oder Zwergpalme, *Serenoa repens* (BARTR.) SMALL (= *Serenoa* [*Serenaea*] *serrulata* HOOK. fil. = *Sabal serrulata* ROEM. et SCHULT.) gehört zur Familie der Arecaceae (Palmen), der Unterfamilie der Coryphoideae und dem Tribus Corypheae.

Die Pflanze kommt hauptsächlich in den küstennahen Sumpfwäldern der südlichen Staaten von Nordamerika vor. Sie ist charakteristisch für die Strandvegetation der Swamps (1).

Sabal serrulata ist eine niederstämmige Buschpalme mit kriechendem Rhizom, fächerförmig scharf gesägten Blättern mit stacheligen Blattstielen. Die kleinen in dicht behaarten axillären Blütenständen stehenden Blüten bilden eine rispige Verzweigung, die Blätter überragen die Blütenkolben.

Die Früchte bestehen aus eiförmigen, einsamigen Beeren von 1 - 3 cm Länge und 0.5 - 1.5 cm Dicke. Die frischen Beeren sind außen braunschwarz, glatt, im getrockneten Zustand runzlig-netzig und oft ölig.

Die Fruchtschale der getrockneten Beere hat eine Dicke von etwa 1 - 3 mm. Sie gliedert sich in ein scharf begrenztes Epi-, Meso- und Endokarp. Perikarp und Samen sind nicht miteinander verwachsen.

Das glänzende schwarzbraune Epikarp gliedert sich in Kutikula, in eine Zellreihe Epidermis und Hypodermis, großzelliges, dünnwandiges Parenchymgewebe mit Fetttröpfchen und - besonders zum Mesokarp hin in einzelne kollenchymatisch verdickte, stark getüpfelte Zellen.

Der Zellinhalt aller Epikarpzellen ist gleichmäßig braun gefärbt. Das gelbbraune Mesokarp, das zu einer dünnen Schicht zusammengetrocknet ist, besteht aus einem großzelligen parenchymatischen Gewebe mit vielen gelben Fetttröpfchen und einzeln oder in Gruppen auftretenden, gelblichen, stark getüpfelten Steinzellen. Im Längsschnitt erkennt man Gefäßbündelstränge aus dünnen, schraubigen Tracheiden mit den für Palmfrüchte typischen begleitenden Kieselzellen.

Das gelbe Endokarp enthält mehrere Steinzellschichten mit einzelnen Fetttröpfchen und wasserlöslichen weißen Kristallnadeln.

Das äußerst harte, hornartige Endosperm ist charakteristisch für Palmfrüchte (2). In Kalilauge quillt es stark zu einer gallertigen Masse auf. Die Zellwände des inneren Endosperms besitzen eine eigenartige kugelige Verdickung.

2.0 Chemie der bisher bekannten Inhaltsstoffe

READ (3) beobachtete beim Stehenlassen des Preßsaftes aus frischen Früchten die Bildung von 3 Phasen: einer ätherischen und einer fetten Ölphase, die sich nicht miteinander mischten, und einer süßschmeckenden Wasserphase.

GILDEMEISTER und HOFFMANN (4) gewannen dieses ätherische Öl durch Abhebern aus einem Preßsaft der Früchte, der mit Alkohol konserviert war. COBLENZ (5) erhielt durch Wasserdampfdestillation ein stechend riechendes, Kopfschmerzen erzeugendes ätherisches Öl. SHERRARD (6) bestimmte in getrockneten, reifen Früchten den Gehalt des ätherischen Öles zu 0.54% und den des fetten Öles zu 12.8%.

SHERMAN und BRIGGS (7) fanden im Fruchtfleisch fast reifer Früchte etwa 1.5% eines Öls, das sie durch Vakuumdestillation fraktionierten. Sie ermittelten für den Fettsäureanteil Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Palmitin- und Ölsäure und 38% einer Fraktion, die aus den Äthylestern dieser Fettsäuren bestand.

SCHREINER (8) fand in luftgetrockneten Früchten nur Spuren eines ätherischen Öles und brachte den von SHERMAN und BRIGGS gefundenen weitaus höheren Gehalt mit dem zur Konservierung verwendeten Alkohol in Zusammenhang. GRIEBEL und BAMES (9) bewiesen das Vorhandensein eines "esterifizierenden Enzyms", das offenbar spezifisch Fettsäuren mit einwertigen wasserlöslichen Alkoholen, besonders Äthanol veresterte. Nach KLOSS (10) hat das aus dem Preßsaft gewonnene Öl folgende Fettsäurezusammensetzung:

Capronsäure	4.2%	Myristinsäure	10.0%
Caprylsäure	4.6%	Palmitinsäure	7.3%
Caprinsäure	0.9%	Ölsäure	42.4%
Laurinsäure	30.7%		

GRIEBEL und BAMES (9) vermuteten im Fett der Früchte Carotinoide, während HÄNSEL (11) im Fruchtfleisch drei Sterine nachweisen konnte, die im Pflanzenreich nicht ubiquitär vorkommen. Er verglich sie dünnschichtchromatographisch mit β -Sitosterin, Östron und Östriol, fand jedoch keine Übereinstimmung.

GRIEBEL (12) beschreibt einen Gerbstoff, der nicht zu den Pyrogallolgerbstoffen gehört, ferner erhebliche Mengen an Invertzucker und Mannit, sowie eine freie, unbekannte, mit Blei nicht fällbare Säure (9).

JAUD (13) erhielt bei seiner Prüfung auf Alkohole, Purine und Saponine keinen positiven Hinweis. An weiteren Inhaltsstoffen fand er noch Chlorogen-, Kaffeesäure und myo-Inosit. Anstelle des von GRIEBEL und BAMES (9) beschriebenen Invertzuckers, konnte er nur Fructose nachweisen.

HÄNSEL et al. (14) isolierten freie Anthranilsäure, die bis dahin nur als Stoffwechselprodukt von Pilzen und Bakterien (15,16,17,18) beschrieben wurde.

PEARL (19) hat in eine umfangreiche Untersuchung über die Phenole von Palmhölzern auch *Sabal serrulata* mit einbezogen. Durch saure Hydrolyse des Stammholzes und der holzigen Blattstiele und anschließende Extraktion mit Äther fand er folgende Verbindungen:

Vanillin	0.3%	Vanillinsäure	1.5%
Syringaaldehyd	0.8%	Syringasäure	1.0%
p-Hydroxybenzaldehyd	0.6%	p-Hydroxybenzoesäure	61.8%
Acetovanillon	0.6%	Ferulasäure	1.9%
Acetosyringon	0.9%		

3.0 Pharmakologie

3.1 Verwendung in der Volksmedizin

Die Früchte der Sabalpalme werden in ihrem Verbreitungsgebiet als Kräftigungsmittel bei kachektischen Zuständen, als Expektorans, Diuretikum und Sedativum verwendet (20). Abgemagerte Tiere sollen nach dem Verzehr der ölhaltigen Früchte schnell Fett ansetzen (21). Die ungesetzliche Verwendung von Sabalfrüchten als Geschmackskorrigens für Weinbrand führte zu einer ersten eingehenden chemischen Untersuchung (9). Im europäischen Raum wird die Droge in Form von alkoholischen und wässrigen Extrakten seit Jahrzehnten in der Therapie von Prostataerkrankungen verwendet (21). Weitere Indikationen sind: Cystitis, Enuresis, Tripper, Mastitis, Ovaralgie (1,22), Fluor albus, Ekzeme und infantile Mammas (23). Die frischen, reifen Früchte wurden in das Homöopathische Arzneibuch (HAB 1934) und in die homöopathische Pharmakopöe der USA (HP US 44) aufgenommen.

3.2 Bisherige pharmakologische Untersuchungen

Nach BRAUN (24) und HEGNAUER (25) fördert die Droge die Durchblutung des Urogenitalsystems und steigert die Harnmenge. DRAGENDORFF (26), SCHINDLER (1) und REHM (27) beschrieben bei Tieren einen außerordentlich starken Fett-

ansatz nach Verabreichung von Sabalfrüchten. Die Ursache sahen sie im Fettreichtum des Fruchtfleisches und der Samen. Über die antibiotische Wirkung eines alkalischen Acetonextraktes aus den Blättern gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und Hefen berichtet NICKEL (28). ELGHAMRY und HÄNSEL (29) untersuchten die östrogene Aktivität eines vorgereinigten Methanolextraktes sowie von β -Sitosterin, durch Testung am juvenilen Mäuseuterus. Sie verglichen die Wirkung mit $17\text{-}\beta\text{-Östradiol}$ und fanden für den Extrakt eine etwa 10^{-4} fache und für β -Sitosterin eine 8×10^{-2} fache Östradiol-Wirkung.

Nach BACH (30) soll β -Sitosterin außer bei der nicht infektiösen Prostatitis auch bei entzündlich rheumatischen Erkrankungen wirksam sein. Als Wirkmechanismus wird eine Prostaglandin-Synthetase-Hemmung angenommen, da auch bei Prostataadenom ein erhöhter Prostaglandinspiegel vorliegt.

Nach VOGEL (31) zeigte eine Acetonfällung aus den Früchten eine sehr gute Hemmung beim Carrageeninödem der Rattenpfote.

B. Problemstellung

Einen ersten Hinweis auf ein mögliches antiphlogistisches Wirkprinzip gaben die Untersuchungen von HÄNSEL et al. (11), die wie unter A. erwähnt, drei nicht ubiquitär vorkommende Sterine im unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes aus Epi- und Mesokarp beschrieben. Die Struktur dieser Sterine konnte nicht geklärt werden. Nachdem dem β -Sitosterin eine antiphlogistische Wirkung zugeschrieben wird (30), wäre denkbar, daß in Sabal noch andere, vielleicht wesentlich wirksamere Sterine vorlagen.

Einen weiteren Hinweis gaben Arbeiten von MÜNZING (32) an anderen Drogen. MÜNZING prüfte eine Reihe von Drogenextrakten auf ein vermeintlich ubiquitäres antiinflammatorisches Wirkprinzip, indem er einige ausgewählte Drogen mit Wasser extrahierte und die wässrigen Auszüge mit Aceton fällte. Die Acetonfällungen wurden gefriergetrocknet und am Rattenpfotenödem getestet. Bezogen auf eine 30%ige Hemmwirkung (D_{eff} 30%), lagen die Dosierungen bei 0.1 - 4 mg/kg i.v.. Als besonders gut wirksam erwiesen sich unter anderem auch die Extrakte aus den Früchten der Palmen *Cocos nucifera* und *Elaeis guineensis*.

Aus Sojabohnen wurde von ihm ein antiödematös wirksames Prinzip angereichert, das eine Ödemhemmung von 30% bei einer Dosierung von 0.09 mg/kg zeigte.

Es war daher naheliegend, zu überprüfen, ob sich aus Sabalfrüchten durch analoge Anreicherungsversuche ein ähnliches Prinzip isolieren ließ.

C. Eigene chemische Voruntersuchungen

Wir untersuchten zunächst den Lipidanteil der Droge und stellten aus frischen, getrockneten Früchten einen Petrolätherextrakt her. Diesen Extrakt verseiften wir mit 20%iger äthanolischer Kalilauge und schüttelten schließlich den unverseifbaren Anteil mit Petroläther aus. Die Petrolätherlösung war intensiv gelb gefärbt. Eine positive CARR-PRICE-Reaktion (33,34) deutete auf das Vorliegen von Carotinoiden hin. Überlagerungs-UV-Spektren mit α -/ β -Carotin aus Karotten bestätigten diesen Hinweis (s.Abb. 1).

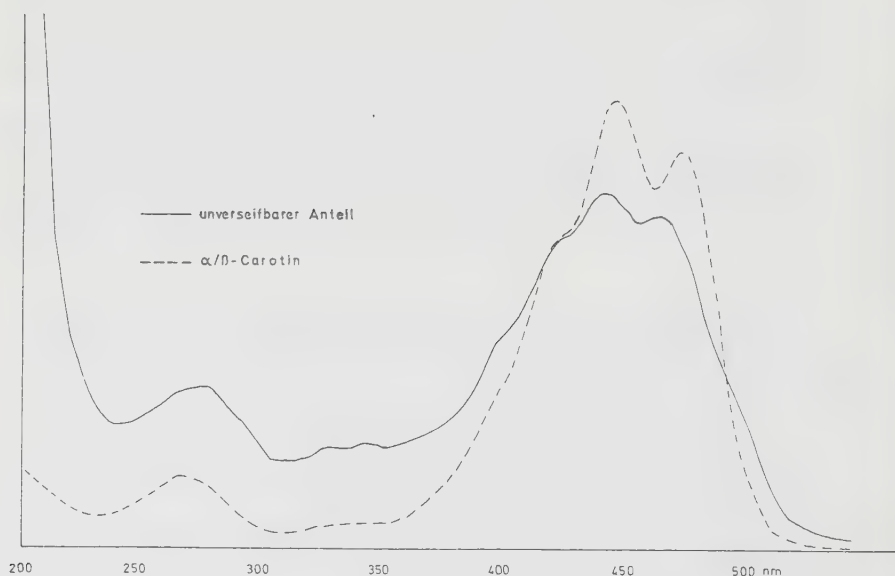


Abb. 1

Überlagerungs-UV-Spektrum des unverseifbaren Anteils aus dem Petrolätherextrakt mit α -/ β -Carotin aus Karotten

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung über Kieselgel mit dem von HÄNSEL (11) verwendeten Fließmittelsystem (Chloroform-Aceton 9:1) und Detektion mit KOMAROWSKY's (34)*) Reagenz erbrachte kein zufriedenstellendes Trennergebnis. Als optimales Fließmittel fanden wir das System c-Hexan-Äthylacetat-Äthanol (75:20:5) (s.Abb. 2).

Unter den, über den gesamten R_f -Bereich verteilten gelben Flecken, traten 4 Hauptflecken hervor. Fleck 1 zeigte Übereinstimmung mit dem von HÄNSEL et al. (11) beschriebenen β -Sitosterin. In der Kälte erhielten wir aus der eingeeengten Petrolätherlösung des unverseifbaren Anteils einen weißen Niederschlag, der nach Reinigung mit Aktivkohle und Umkristallisieren aus Petroläther und Aceton, 70 mg einer chromatographisch einheitlichen Substanz (Fleck 2, Abb. 2) vom Smp. = $86 - 87^\circ$ lieferte.

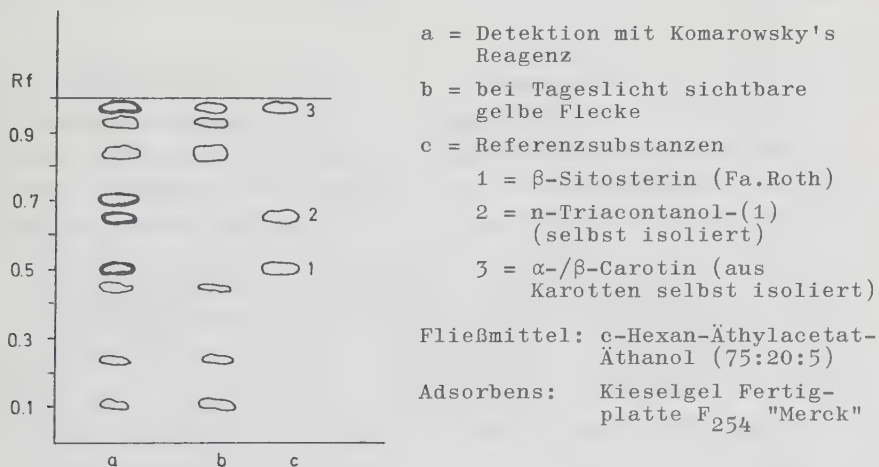


Abb. 2

DC-Schema des unverseifbaren Anteils aus dem
Petrolätherextrakt

*) Dieses Reagenz wird als Sprühreagenz auf Sapogenine und Corticosteroide verwendet. Es ist sehr wenig spezifisch, aufgrund seiner großen Palette an Farbabstufungen, jedoch universell für organische Verbindungen verwendbar.

Nach dem Massenspektrum hatte die Substanz ein Molekulargewicht von 438. Der kaum wahrnehmbare Massenpeak, die Wasserabspaltung ($M-18 = 420$) und die in gleichmäßigen Abständen von 14 Masseneinheiten (CH_2 -Gruppen) erfolgende Fragmentierung sprachen für einen primären aliphatischen Alkohol. Das UV-Spektrum wies oberhalb 200 nm kein Maximum auf. Das IR-Spektrum mit einer starken OH-Valenzschwingung bei 3330 cm^{-1} und starken CH-Valenz- und Deformationsschwingungen bei 2910 und 2840 cm^{-1} , bzw. 1050 cm^{-1} bestätigte das Massenspektrum. Das H-NMR-Spektrum war einfach zu interpretieren. Ein Triplett bei $\delta = 0.9 \text{ ppm}$, das für 3 Protonen integrierte, entsprechend einer endständigen CH_3 -Gruppe, ein nicht aufgelöstes Multiplett bei $\delta = 1.3 \text{ ppm}$ mit einer relativen Intensität für 56 Protonen, entsprechend 28 CH_2 -Gruppen, ein Triplett bei $\delta = 3.65 \text{ ppm}$ für eine $\text{CH}_2\text{-O}$ -Gruppe und ein kleiner Peak bei $\delta = 1.55 \text{ ppm}$ für eine OH-Gruppe, waren ein weiterer Beweis für einen primären geradkettig-aliphatischen Alkohol.

Aus diesen Daten schlossen wir auf den Wachsalkohol n-Triacontanol- (1) der Formel $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{28}-\text{CH}_2\text{OH}$. Der Schmelzpunkt stimmte mit den Literaturangaben (35,36) überein. Diese Substanz, die unter dem Trivialnamen Melissylalkohol bekannt ist, war bisher aus Blattwachsen von Coniferen, Apfelschalen, Reiskeimen und verseiftem Mandragorawurzelöl isoliert worden (35).

Mit den von EGGER et al. (37) angegebenen Laufmittelsystemen konnten auf Polyamidplatten 4 bei Tageslicht unterschiedlich intensiv gelb gefärbte Zonen nachgewiesen werden. Im R_f -Wert erwies sich nur β -Carotin mit dem Hauptfleck identisch.

Von den übrigen gelben Flecken stimmten die R_f -Werte mit den von EGGER angegebenen Werten für Lycopin, α -Carotin und Violaxanthin oder Neoxanthin weitgehend, jedoch nie völlig überein.

Die quantitative photometrische Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehaltes ergab einen Wert von 0.522%, bezogen auf den unverseifbaren Anteil des Petroläther- und Ätherextraktes, und

von 6.75 mg%, bezogen auf die getrocknete Droge, berechnet als β -Carotin.

Die weiteren auf dem DC-Schema (Abb. 2, S. 9) erkennbaren Flecken wurden nicht näher untersucht. Die von HÄNSEL (11) beschriebenen Sterine konnten nicht gefunden werden.

Bei der später durchgeführten dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Methanolfällungen des wässrigen Extraktes (s. D. 1.0, S. 15) fielen zwei Flecken auf, die bei der Chromatographie in sehr polaren Fließmitteln, R_f -Werte von ca. 0.05 - 0.2 bzw. 0.3 - 0.7 aufwiesen. Die Fällungen wurden über Kieselgel in den Fließmittelsystemen Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) und Methanol-Wasser (75:25) chromatographiert. Durch Detektion mit KOMAROWSKY's Reagenz ließen sich drei Flecken unterscheiden, die sich grün (Startfleck), lila (Substanz B, im untersten R_f -Bereich) und ebenfalls grün (Substanz A, im mittleren R_f -Bereich) anfärben ließen.

Substanz A

Hydrophiles Verhalten und Anfärbung mit Anilin-Phthalat-Reagenz ließen einen reduzierenden Zucker vermuten. Vergleichschromatographie mit infrage kommenden Zuckern in den oben genannten Fließmittelsystemen, sowie im System n-Butanol-Äthanol-Ammoniak 25% (7:3:5) ergab gleiches chromatographisches Verhalten wie Fructose. Die Reaktion nach SELIWANOFF (38) war positiv. Das von Substanz A hergestellte Acetat zeigte in den Fließmittelsystemen Benzol-Methanol (95:5) und Cyclohexan-Äthylacetat-Äthanol (75:20:5) gleiches chromatographisches Verhalten, wie auth. Fructoseacetat. Dieses Ergebnis bestätigte die Angaben von JAUD (13).

Substanz B

Detektion der Chromatogramme mit Bromkresolgrün (34) wies auf eine organische Säure hin. Vergleichschromatographie mit ubiquitär im Pflanzenreich vorkommenden sehr hydrophilen Säuren ließen Zitronensäure vermuten. Sie dürfte mit der von

GRIEBEL und BAUMES (9) erwähnten freien Säure identisch sein. Zum spezifischen Nachweis und zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung der Zitronensäure wurden die Kerne und Schalen getrennt, am Soxhlet mit Äther entfettet und mit Wasser perkoliert. Die Wasserextrakte wurden nach Konzentrierung direkt zur Citratbestimmung verwendet. Diese erfolgte auf enzymatischem Wege (39) durch Spaltung von Citrat mit Citrat-Lyase in Oxalacetat und Pyruvat, die ihrerseits durch NADH in Gegenwart von Malat- und Lactatdehydrogenase zu Malat und Lactat reduziert werden. Dabei wird der Verbrauch an NADH photometrisch bestimmt.

Im Schalenanteil fanden wir einen Gehalt von 0.17%, im Kernanteil von 0.14%, das sind 0.15% bezogen auf die Gesamtdroge.

Da von den isolierten bzw. nachgewiesenen Verbindungen keine für die gesuchte antiphlogistische Wirkung in Betracht kam, konzentrierten wir unsere weiteren Untersuchungen auf Unterfraktionen des wässrigen Sabalextraktes.

D. 1.0 Herstellung und Untersuchung pharmakologisch wirksamer
Fractionen

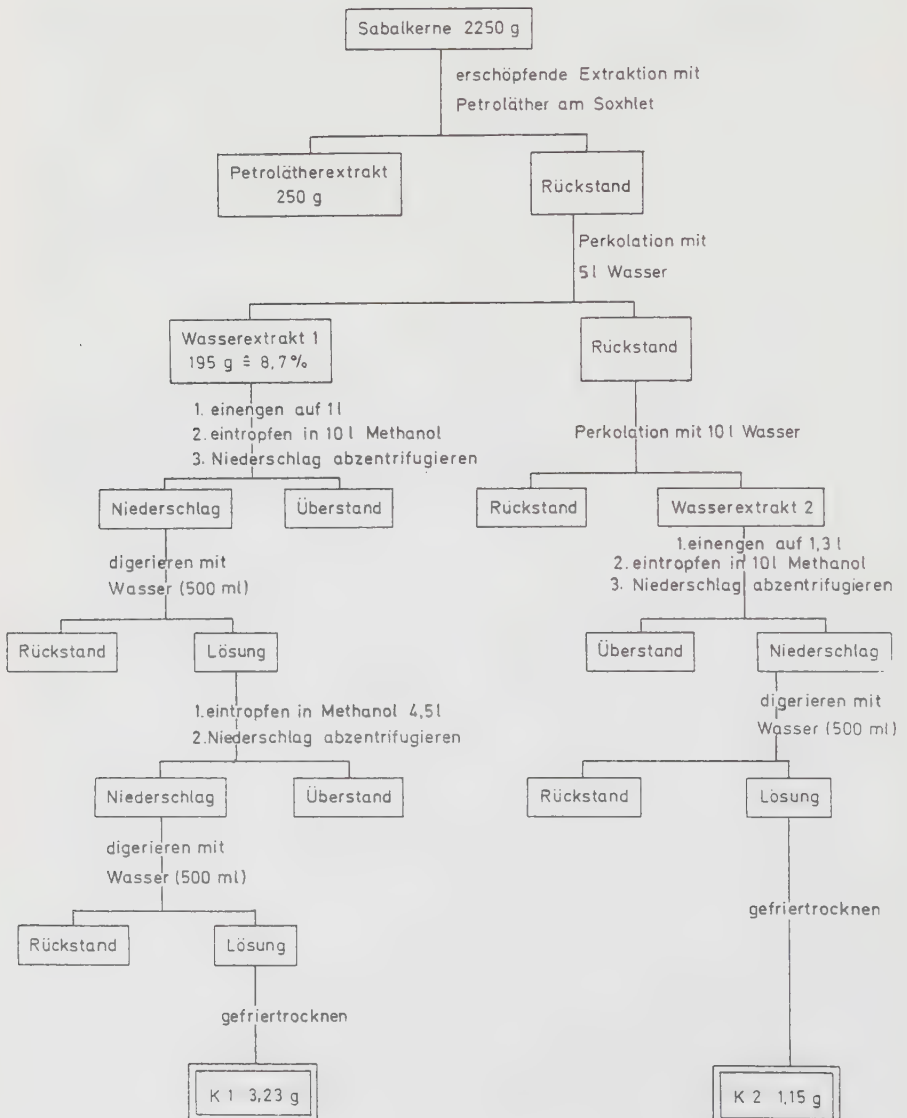
- 1.1 MÜNZING (32) hatte zur Darstellung einer antiphlogistisch wirksamen Fraktion aus Sojabohnen Aceton als Fällungsmittel verwendet. Nach seinen orientierenden Untersuchungen vermutete er in der Fraktion das Vorliegen eines Peptidoglycans. Die in der Literatur (40,41,42) am häufigsten beschriebenen Fällungsmittel für Peptidoglycane und Polysaccharide aus wässrigen Lösungen sind Äthanol und Methanol. Wir entschieden uns für das polarere Methanol, um Begleitsubstanzen so weit wie möglich in Lösung zu halten.

Für die ersten Untersuchungen verwendeten wir die von Fruchtfleisch und -schalen befreiten Kerne. Sie wurden gemahlen und am Soxhlet erschöpfend mit Petroläther entfettet. Der Rückstand wurde getrocknet und anschließend mit Wasser bei Raumtemperatur perkoliert. Den Wassereextrakt engten wir bei 40⁰ im Vakuum ein und ließen ihn in Methanol eintropfen. Die entstehende weiße, flockige Fällung zentrifugierten wir ab und digerierten sie mit Wasser. Die erhaltene Lösung wurde einer Methanolfällung unterworfen und der Niederschlag wieder mit Wasser digeriert. Die wasserlöslichen Anteile wurden gefriergetrocknet und lieferten K 1.

Ähnlich wurde mit dem Rückstand des Wassereextraktes 1 verfahren. Die Weiterbehandlung führte zu einer Fraktion K 2. Das Schema 1, S. 14, gibt eine Übersicht über den detaillierten Isolierungsweg.

Die Ausbeute der gefriergetrockneten, weißen bis bräunlichen, wasserlöslichen Fraktionen betrug aus Extrakt 1: 3.23 g (0.14%) und aus Extrakt 2: 1.15 g (0.05%), insgesamt 0.2% bezogen auf die Sabalkerne. Der nach der Methanolfällung nicht wieder lösliche Rückstand war mit 8 g (0.4%) etwa doppelt so viel.

ANREICHERUNG DES ANTIÖDEMATÖSEN WIRKPRINZIPI AUS SABAL-KERNEN WEG I



Schema 1

Als erstes pharmakologisches Testmodell zur Untersuchung dieser Fraktion wählten wir das Carrageenin-Rattenpfoten-ödem, da es wegen seiner leichten Meßbarkeit bzw. Quantifizierbarkeit ein relativ einfach durchführbares Entzündungsmodell (43) darstellt. Carrageenin als Irritans erzeugt die initiale Phase einer Entzündung. (Näheres siehe Pharmakologischer Teil F. 2.1, S. 82).

Ergebnisse:

T a b e l l e 1

Hemmung der Ödembildung in %, 3 Stdn. nach Ödem-
provokation bei der angegebenen Dosierung

Dosierung	0.3	3.0	10.0 mg/kg i.v.
K 1	43.9	52.1	73.2 %
K 2	74.5	77.8	74.5 %

Ein Auszug der Testergebnisse ist in Tab. 1 zusammengestellt.

Daraus geht hervor, daß die Fraktion K 2 bei den Dosierungen 0.3 und 3.0 mg/kg stärker wirksam war als K 1. Zudem zeigte K 2 keine Dosis-Wirkungsabhängigkeit, die bei diesem Test niedrigste Dosierung lag schon im supra-maximalen Bereich. Vor weiteren Anreicherungsschritten führten wir einige analytische Untersuchungen durch.

Analytische Untersuchungen der Fraktionen K 1 und K 2

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Methanolfällungen im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) aus Kieselgel (siehe Kapitel C, S. 11) fanden wir nur Fructose und Zitronensäure. Diese Substanzen machten chromatographisch nur einen sehr geringen Mengenanteil der getesteten Gesamtfractionen aus. Andere organische Verbindungen waren nach dem H_2SO_4 -Test auf der Kieselgelplatte nicht nachweisbar. Als antiphlogistisch

wirksames Prinzip schieden sie von vorneherein aus. Das wirksame Prinzip, das offenbar völlig am Startfleck geblieben war, mußte demnach hochmolekular und sehr hydrophil sein.

In einer 2. Untersuchungsreihe wurde in den Fraktionen der Aschegehalt bestimmt. Tabelle 2 gibt die gefundenen Werte wieder:

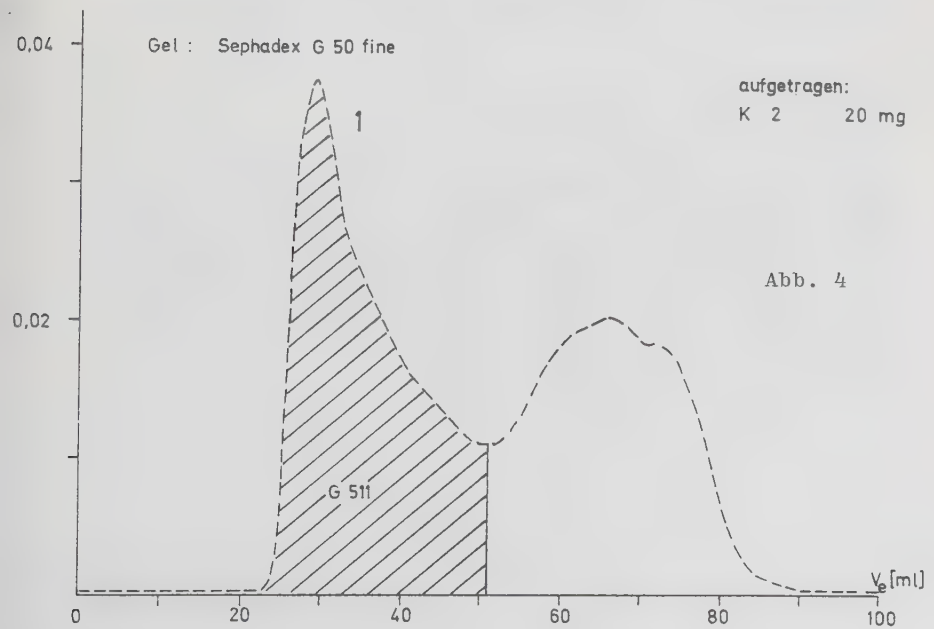
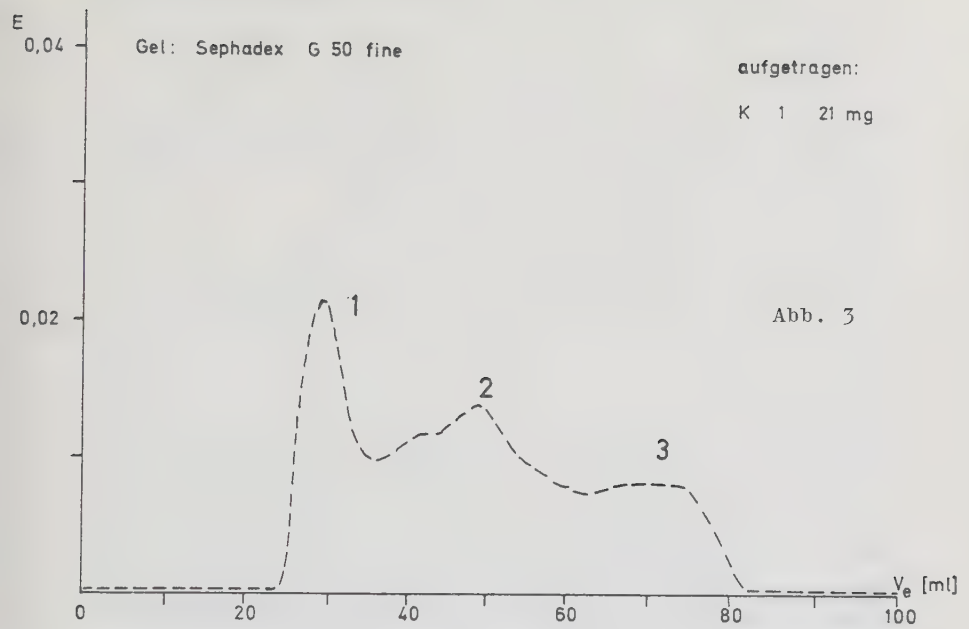
T a b e l l e 2

Fraktion	K 1	K 2
Aschegehalt %	25.6	23.8
Ödemhemmung % bei 3 mg/kg	52.1	77.8

Wie Tabelle 2 zeigt, geht mit der Abnahme des Aschegehalts eine deutliche Steigerung der antiödematösen Wirksamkeit einher.

Zusätzlich wurden die Fraktionen einer orientierenden Gelchromatographie über Sephadex G 50 mit Wasser als Eluens unterworfen. Dabei zeigte sich, daß bei der pharmakologisch wirksameren Fraktion K 2 im Vergleich zu K 1 der höhermolekulare Peak (1) im Verhältnis zu den folgenden überwog (s. Abb. 3 und Abb. 4, S. 17).

Da mit der Abnahme des Aschegehaltes und der Zunahme des Anteils an höhermolekularen Fraktionen die ödemhemmende Wirkung zunahm, sollte eine Wirkungssteigerung durch Dialyse und/oder präparative Gelchromatographie zu erzielen sein.



Dialyse von K 1 und präparative Gelchromatographie von K 2

Wir dialysierten einen Teil der Fraktion K 1 4 Tg. lang bei etwa Leitungswassertemperatur (ca. 13°C) gegen destilliertes Wasser. Es bildeten sich im Retentat und Dialysat unlösliche bräunliche, schleimige Niederschläge. Das Retentat wurde filtriert, gefriergetrocknet und gewogen (K 1 d). Die Ausbeute betrug 27%.

Analytische Gelchromatographie über Sephadex G 50 zeigte, daß nach der Dialyse die hochmolekulare Fraktion (1) bei weitem den Hauptanteil des Retentates ausmachte (s. Abb. 5, S. 20).

Die bisher wirksamste Fraktion (K2) versuchten wir durch präparative Gelchromatographie noch weiter aufzutrennen. Als Trenngel verwendeten wir, wie bei der analytischen Gelchromatographie Sephadex G 50 und als Elutionsmittel Wasser. Vergleiche der Elutionsvolumina von Dextranblau (MG: 2×10^6), das zur Ermittlung des Außenvolumens der Trenngele verwendet wurde, mit der am Anfang eluierten Fraktion aus den Sabalfällungen ergaben in etwa gleiche Werte.

Daraus schlossen wir für diese Fraktion auf ein Molekulargewicht von über 50 000.

Zur weiteren Anreicherung trennten wir die im Bereich des Außenvolumens der Säule befindlichen Fraktionen ab. Nach Gefrier Trocknung der vereinigten Fraktionen erhielten wir aus insgesamt 130 mg Ausgangssubstanz K 2 29 mg eines bräunlich-weißen Pulvers (G 511). Diese Menge entsprach etwa einem Viertel der Ausgangsmenge.

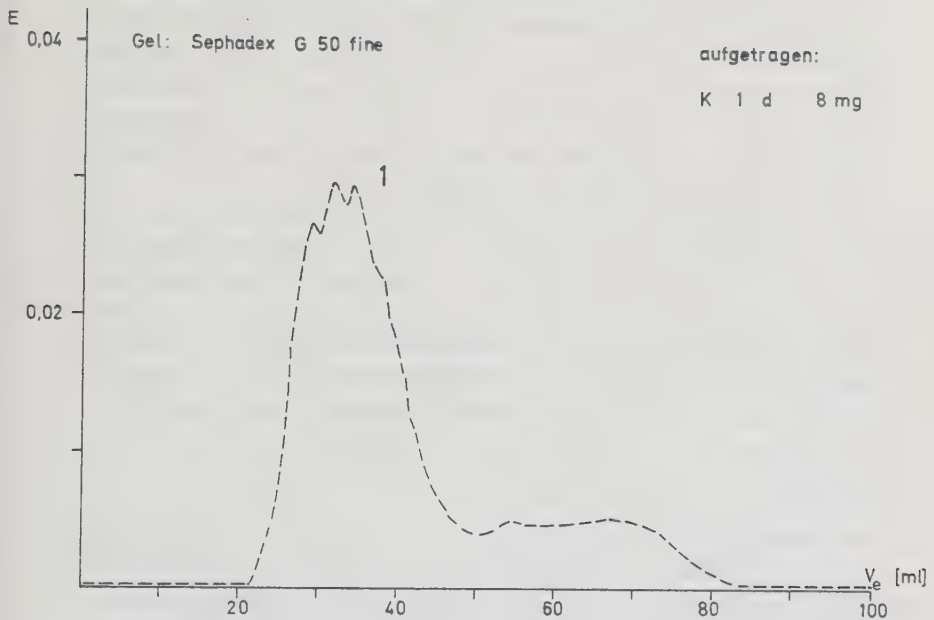


Abb. 5

T a b e l l e 3

Hemmung der Ödembildung in %, gemessen
3 Stdn. nach Ödemprovokation

Fraktion	0.3	3.0	10.0 Dosis mg/kg
K 1	43.9	52.1	58.2 %
K 1 d	40.9	78.1	83.2 %
K 2	74.5	77.8	81.2 %
G 511	74.0	81.8	nicht getestet

Wie aus Tabelle 3, S. 19, hervorgeht, konnte durch die Dialyse bei den Dosierungen 3.0 und 10.0 mg/kg eine signifikante Wirkungssteigerung von über 40% erzielt werden. Dieses Ergebnis war aufgrund des Überwiegens der hochmolekularen Fraktion zu erwarten (s. Abb. 5, S. 19). Allerdings war die dialysierte Substanz braun verfärbt und nicht mehr klar löslich, so daß möglicherweise eine Artefaktbildung bei der Herstellung eingetreten war.

Die Wirkungssteigerung, die nach der präparativen Gelchromatographie von Fraktion G 511 gegenüber der Ausgangsfraktion K 2 gemessen wurde, erschien zunächst nicht sehr signifikant, da die getesteten Dosen bereits im supramaximalen Bereich lagen. Deshalb wurden bei den späteren Testen der angereicherten hochmolekularen Fraktionen die Dosierungen um etwa den Faktor 10 gesenkt (siehe Kapitel D. 4.1, S. 50).

Das nächste Ziel bestand darin, für die Herstellung dieser hochwirksamen Fraktion einen möglichst einfachen Isolierungsweg zu finden, der eine artifizielle Veränderung der genuin vorliegenden Substanzen ausschloß. Außerdem war zu klären, ob das wirksame Prinzip nur in den Kernen, oder auch im Fruchtfleisch und in den Schalen enthalten war.

2.0 Weg II: Verbesserter Isolierungsweg im Großansatz

20 kg luftgetrocknete Früchte wurden durch Zerschlagen und Absieben, bzw. Handverlesen in etwa 44% Kerne und 56% Schalenanteil getrennt.

Die Extraktion der gemahlenden Anteile erfolgte in einer industriellen Extraktionsanlage *) (siehe Schema 2, S. 22). Die Dichlormethan- und Äthylacetatextrakte wurden verworfen, die Wasserextrakte schonend bis auf etwa ein Fünftel eingengt und in die vierfache Menge Methanol eingetropt.

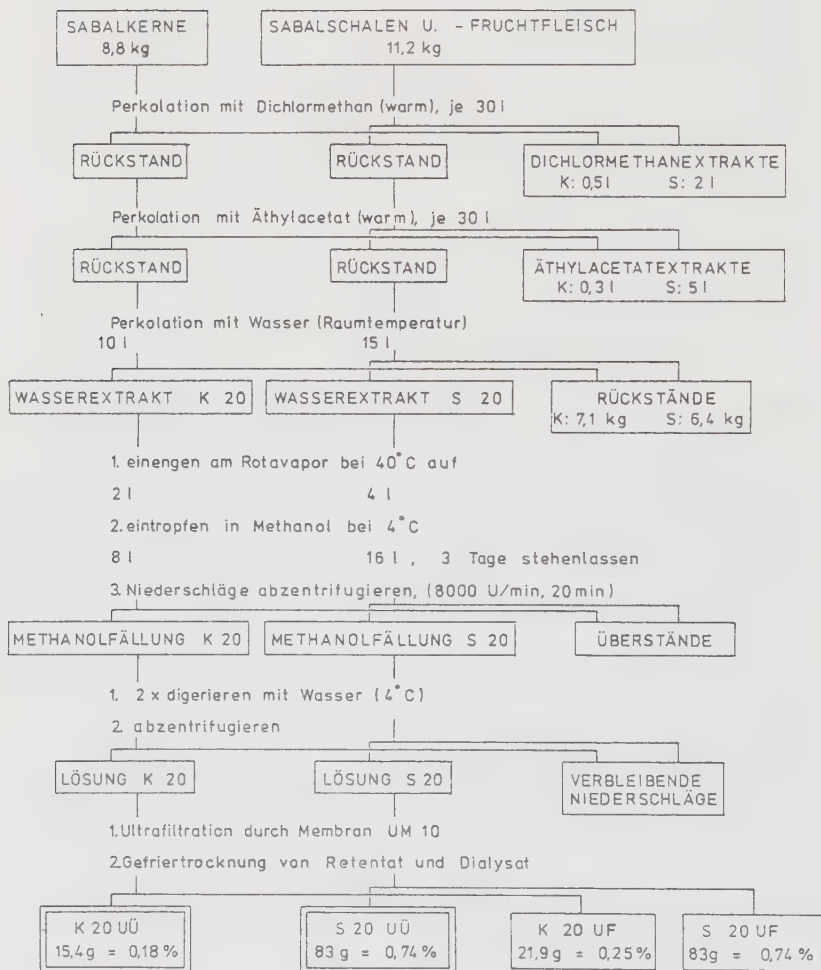
Die Weiterverarbeitung erfolgte in der Weise, daß die Fällung erneut in Wasser suspendiert und der wieder in Wasser lösliche Anteil vom nicht löslichen Rückstand durch Zentrifugieren getrennt wurde.

Diesen Wasserextrakt unterwarfen wir diesmal einer Ultrafiltration (Diafiltration) (44). Die Ultrafiltration ist ein Verfahren der Membranfiltertechnik mit einem Trennbereich für Makromoleküle > 500 MG. Im Unterschied zum Konzentrationsverfahren Ultrafiltration wird bei der Diafiltrationstechnik die Flüssigkeit der Ausgangslösung durch reines Lösungsmittel ersetzt.

Im Prinzip unterscheidet sich die Membranfiltration nicht von der konventionellen Filtration. Der Unterschied liegt jedoch in den Dimensionen der abgetrennten Partikel. Konventionelle Filter trennen Partikel, während mit Hilfe der Membranfiltration Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden.

*) Fa.Gehrlicher, 8191 Eurasburg

ANREICHERUNG DES ANTIÖDEMATÖSEN WIRKPRINZIPS
AUS SABALFRÜCHTEN WEG IIa



Extraktgehalt insgesamt: Kerne: 1,7 kg = 19,3 %

Schalen: 4,8 kg = 42,9 %

Schema 2

Bei der Ultrafiltration passiert unter einem Druck von wenigen bar das Lösungsmittel (in unserm Fall Wasser) die relativ weiten Poren einer Ultrafiltrationsmembran nahezu ungehindert, während die gelösten großen Moleküle von der Membran zurückgehalten werden. Die kleineren Moleküle, z.B. Salze oder Zucker passieren die Membran. Die Lösung selbst besitzt einen osmotischen Druck, der vom Filtrationsdruck überwunden werden muß, um die Filtration überhaupt erst in Gang zu setzen. Deshalb wird eine derartige Filtration auch als umgekehrte Osmose bezeichnet. Es handelt sich um ein schonendes zeitsparendes Stofftrennverfahren. Durch die Entwicklung von Membranen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften kann die Membranfiltration verschiedenen Stofftrennproblemen optimal angepaßt werden (s. Abb. 6, S. 24).

Selektivität, Trenngrenze und Filtratfluß einer Membran werden unter Umständen erheblich durch die Konzentrationspolarisation beeinflusst. Unter Konzentrationspolarisation versteht man eine Zone erhöhter Konzentration der von der Membran zurückgehaltenen Stoffe in der Grenzschicht der Membranoberfläche. Ihre Konzentration ist unmittelbar an der Membranoberfläche am höchsten und nimmt exponentiell zur Lösung hin ab. Insbesondere bei höhermolekularen Stoffen wird so oftmals die Löslichkeitsgrenze überschritten und es bildet sich eine Deckschicht der zurückgehaltenen Stoffe, die nun ihrerseits wie eine Sekundärmembran wirkt.

Dadurch verringert sich die Trenngrenze der Membran und die Filtrationsleistung sinkt beträchtlich. Man verhindert dies durch ständige Verdünnung der über der Membran stehenden Lösung und durch turbulente Durchmischung durch kräftiges Rühren mit einem Magnetrührer. Um allerdings die Membran nicht zu beschädigen, darf der Magnet diese nicht berühren.

Unter Diafiltration versteht man den volumengleichen Ersatz der Filtratmenge durch eine Waschflüssigkeit während der Filtration. Man erzielt dabei eine rasche und - bei entsprechender Zufuhr von Waschflüssigkeit - nahezu vollständige Abtrennung niedermolekularer Stoffe. Das Verfahren ersetzt die konventionelle Dialyse und arbeitet erheblich schneller, da die Abtrennung der niedermolekularen Stoffe unabhängig von ihrer Konzentration allein durch ihre Filtrationsrate bestimmt wird. Grundsätzlich gibt es zwei Verfahren: ein kontinuierliches und ein diskontinuierliches.

Kontinuierliche Diafiltration

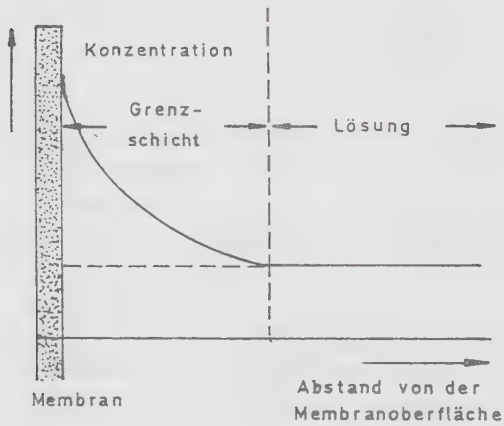
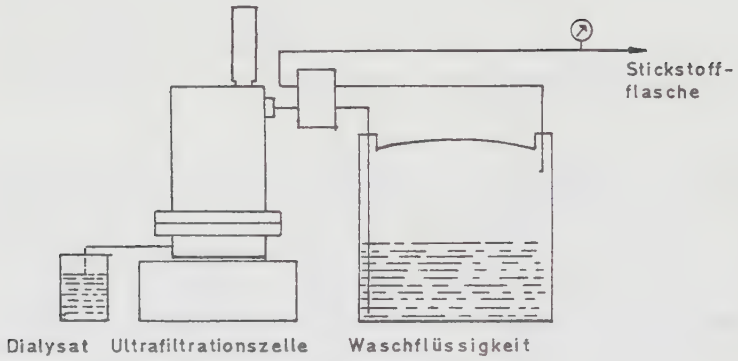


Abb. 6

Beim kontinuierlichen Verfahren wird die Dialyseflüssigkeit durch ein konstantes Volumen an zu dialysierender Lösung gepreßt. Die Abnahme der niedermolekularen Bestandteile kann nach der Beziehung

$$\frac{c_D}{c_0} = e^{-\frac{V_D}{V_0}} \quad (1)$$

berechnet werden. c_0 bedeutet die Konzentration der niedermolekularen Bestandteile in der Ausgangslösung, V_0 ist das Volumen der Ausgangslösung, V_D das Diafiltratvolumen bzw. das zugeführte Volumen an Waschflüssigkeit und c_D die Konzentration der niedermolekularen Bestandteile nach Beendigung der Diafiltration in der Zelle.

Beim diskontinuierlichen Verfahren wird der Zellinhalt immer wieder mit einer bestimmten Lösungsmittelmenge verdünnt. Der Endgehalt an niedermolekularen Stoffen errechnet sich hierbei aus der Formel

$$\frac{c_D}{c_0} = \left(\frac{V_0}{V} \right)^n \quad (2)$$

wobei V_v das Volumen in der Zelle nach der Verdünnung und n die Anzahl der Verdünnungen ist. Der Verbrauch an Lösungsmittel und damit auch der Zeitbedarf ist beim diskontinuierlichen Verfahren allerdings wesentlich höher.

Da uns kein Vorratsdruckbehälter zur Verfügung stand, arbeiteten wir trotz der Nachteile nach dem diskontinuierlichen Verfahren.

Die Molekülgröße der wirksamen Fraktionen war uns damals noch unbekannt. Deshalb begannen wir die Diafiltration mit einer Membran, die eine Ausschlußgrenze für Moleküle vom MG 10 000, bezogen auf nicht geladene sphärische Moleküle, hatte.

Der wasserlösliche Anteil der Methanolfällungen wurde in Portionen zu je 200 ml mit jeweils 500 ml Wasser diafiltriert. Geht man davon aus, daß der Gehalt an gelösten Substanzen jeweils ca. 3 g betrug, von denen maximal 2 g diafiltriert werden konnten, und die Lösung auf 30 ml (V_o) konzentriert wurde, dann ergibt sich für $V_v = 200$ ml und für $n = 3$. Nach Gleichung (2) beträgt dann die Restkonzentration an niedermolekularen Stoffen:

$$c_D = 2 \text{ g} \left(\frac{30 \text{ ml}}{200 \text{ ml}} \right)^3 = 0.007 \text{ g}$$

das sind noch 0.3% der Ausgangskonzentration. Eine noch erschöpfendere Diafiltration hielten wir zu diesem Zeitpunkt nicht für erforderlich, da dieser geringe Anteil an niedermolekularen Stoffen kaum zu einer meßbaren Beeinflussung der pharmakologischen Tests führen sollte. Trotzdem erhielten wir differierende analytische Daten für die einzelnen Retentatfraktionen. Sie lassen sich durch die mit der Zeit doch auftretende Konzentrationspolarisation auf den mehrfach verwendeten Membranen erklären.

Aus 8.8 kg Kernen erhielten wir 15.35 g K 20 UÜ- und 21.88 g K 20 UF-Fraktion. (UÜ = Ultrafiltrationsüberstand, UF = Ultrafiltrat). Dies sind 0.077%, bzw. 0.11%, bezogen auf 20 kg Droge.

Aus 11.2 kg Schalen erhielten wir jeweils 83 g S 20 UÜ und S 20 UF, das sind jeweils 0.415%, bezogen auf 20 kg Droge.

Sowohl Ultrafiltrat, als auch Retentate wurde gefriergetrocknet. Aus den Retentaten versuchten wir das antiödematöse Prinzip weiter anzureichern.

2.1 Weg II b: Gelchromatographie

Zur weiteren Reinigung oder Anreicherung von Polysacchariden, Proteinen oder Proteoglykanen wird in der Biochemie sehr häufig die Gelchromatographie in ihren verschiedenen Modifikationen herangezogen.

Wir verwendeten in den folgenden Experimenten 2 Agarosegele, 2 Dextrangele, 1 Polyacrylamidgel und eine Polyacrylamid-/Agarosegel-Kombination mit jeweils unterschiedlichen Ausschlußgrenzen über einen Bereich von $1.5 \cdot 10^3$ bis 10^6 MG.

Interessanterweise erhielten wir mit allen verwendeten Gelen sehr ähnliche Trennergebnisse. Die Schalenextrakte ließen sich in je zwei, die Kernextrakte in je drei Hauptfraktionen auftrennen. Bei der Elution erhielten wir jeweils einen Peak im Ausschlußbereich (hochmolekularer Bereich) der Gele und einen Peak im niedermolekularen Bereich. Bei den Kernextrakten traten dazwischen ein zusätzlicher Hauptpeak- und je nach Auflösung - zwei weitere Nebenpeaks auf, deren Molekulargewichtsbereiche zwischen dem der zuerst genannten Fraktionen lagen.

Die beste Auflösung der einzelnen Peaks ließ sich mit dem Polyacrylamidgel Biogel P 60^R erzielen. Als Elutionsmittel verwendeten wir reines Wasser, da sich weder durch einen Elektrolytzusatz, noch durch einen pH- oder Ionenstärkegradienten eine Verbesserung des Trennergebnisses erreichen ließ.

Abb. 7 und Abb. 8, S. 28, geben je ein Auftrennungsbeispiel für einen Schalen- und einen Kernextrakt wieder. Peak 1 ist die hochmolekulare, Peak 3 die niedermolekulare Fraktion. Dazwischen liegt beim Kernextrakt (Abb. 8, S. 28) ein weiterer Hauptpeak (2). Diesem Peak gehen bei der analytischen Auftrennung über Biogel P 60 zwei kleinere Nebenpeaks voraus. Bei der präparativen Auftrennung an Sephadex (Dextrangel) und Biogel A 0.5 (Agarosegel) waren diese Nebenpeaks vom Hauptpeak 2 kaum abgesetzt und wurden deshalb mit diesem zusammen pharmakologisch getestet.

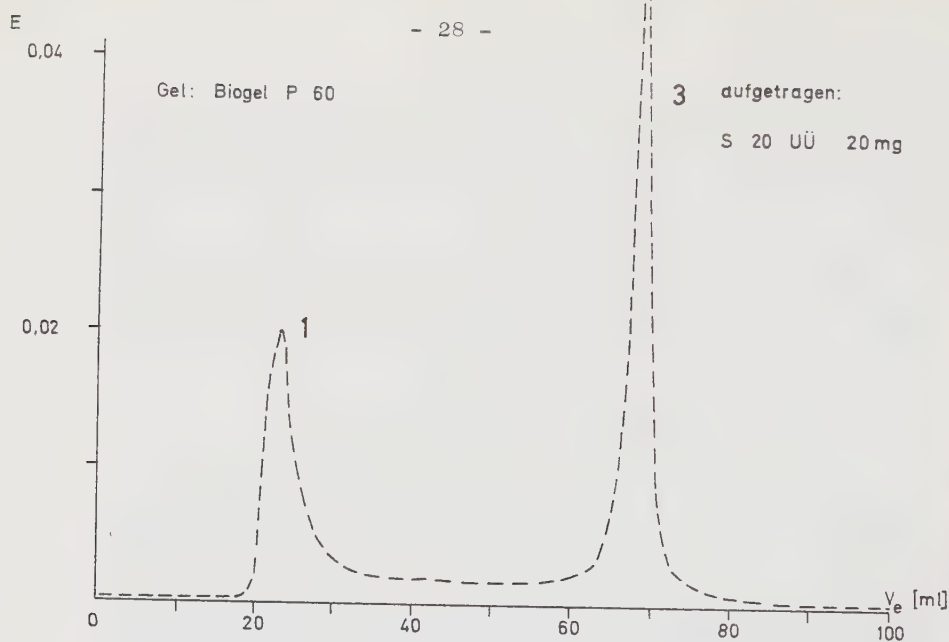


Abb. 7

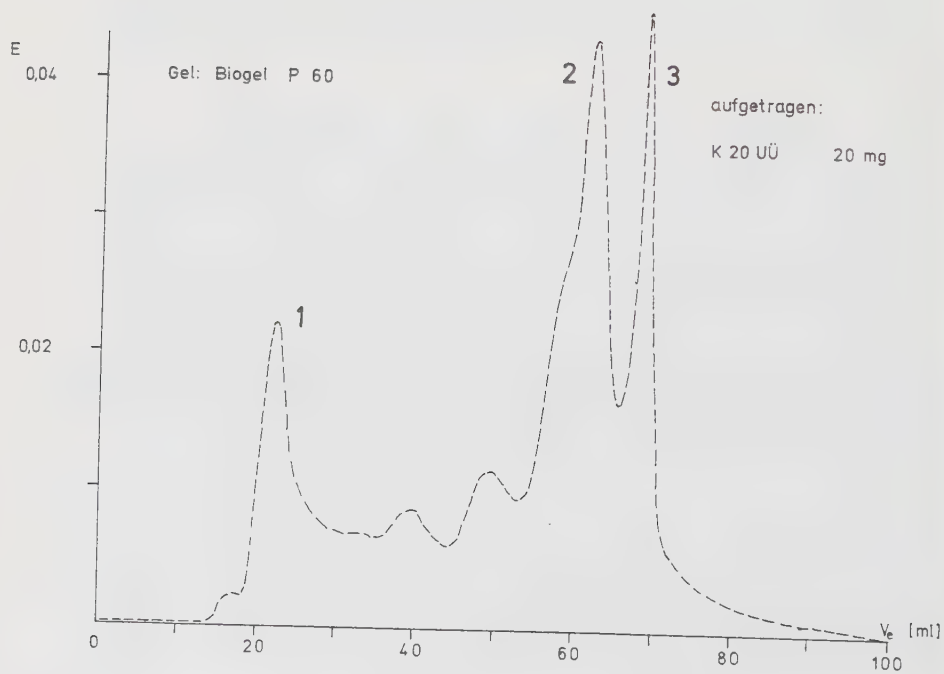


Abb. 8

2.2 Die pharmakologische Testung erbrachte folgendes Ergebnis:
Die Ausgangsfraktionen K 20 UÜ und S 20 UÜ zeigten eine in etwa gleichstarke Hemmung des Carrageeninödems: 3 bzw. 22% Hemmung bei einer Dosierung von 0.3 mg/kg und 64 bzw. 63% Hemmung bei einer Dosierung von 3 mg/kg. Diese Werte entsprachen in etwa denen der Fraktion K 1 aus dem Isolierungs-
weg I.

Bei der Testung der den Peaks 1 - 3 entsprechenden Fraktionen ergaben die Fraktionen 1 eine größere Wirksamkeit als die Ausgangsfraktionen. Die Wirkungssteigerung war jedoch nicht so hoch, wie zunächst erwartet. Dies erklärt sich vermutlich aus der zu diesem Zeitpunkt noch nicht optimalen Trennung.

Die Fraktion 2 aus K 20 UÜ war mit 15% Hemmung bei 3 mg/kg nur gering wirksam, während die Fraktion 3, sowohl aus Schalen- als auch aus Kernextrakt, wieder eine deutliche Wirkungssteigerung zeigte. Die Folgefraktionen (Dialysate K 20 UF und S 20 UF, siehe Schema 2, S. 22), die im MG unter dem der Fraktion 3 lagen (MG < 10 000), waren unwirksam.

Eine Zusammenfassung der pharmakologischen Daten gibt Tabelle 4 wieder.

T a b e l l e 4

Hemmung der Ödembildung 3 Stdn. nach Provokation in %

	Fraktion 1		Fraktion 2		Fraktion 3		Folgefraktion	
	0.3/3 mg/kg		0.3/3 mg/kg		0.3/3 mg/kg		0.3/3 mg/kg	
S 20 UÜ	17	74			7	42	0	10
K 20 UÜ	26	70	10	15	17	56	0	0

Damit war eine den Fraktionen K 2 und K 1 entsprechende, bzw. höhere Wirkung nicht erreicht worden. Dies kann folgende Gründe haben:

1. Die einzelnen getesteten Fraktionen waren ungenügend aufgetrennt, so daß es zur Überschneidung von wirksamen und unwirksamen Substanzen gekommen war.
2. Bei Isolierungsweg I waren bei der Aufarbeitung der Fraktionen Artefakte entstanden, die eine größere Wirksamkeit zeigten, als die genuin vorliegenden Substanzen. Ein Hinweis in dieser Richtung könnte sein, daß die Fraktionen K 2 und K 1 d bräunlich, die neu gewonnenen jedoch rein weiß waren.
3. Die chemische Zusammensetzung des Polymerenanteils der Drogen variiert von Charge zu Charge.

2.3 Analytik

Zur Charakterisierung der einzelnen Fraktionen wurde Asche- und CHN-Bestimmungen durchgeführt.

T a b e l l e 5
Analytik Schalenfraktionen

	S 20 UÜ	Fraktion 1	Fraktion 3
Asche(%)	10.50	1.16	11.90
C (%)	36.9	39.3	34.3
H (%)	4.82	5.13	4.48
N (%)	0.16	0.70	0
Ödemhemmung bei 3 mg/kg (%)	63	74	42

T a b e l l e 6
Analytik Kernfraktionen

	K 20 UÜ	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3
Asche (%)	11.90	3.67	0	22.1
C (%)	37.1	40.8	41.5	27.5
H (%)	5.11	5.32	5.79	4.34
N (%)	6.16	2.46	14.4	1.22
Ödemhemmung bei 3 mg/kg (%)	64	70	15	56

Der Hauptunterschied zwischen Schalen- und Kernfraktionen liegt im Stickstoffgehalt. In den ersten sind nur Spuren an Stickstoff nachweisbar, während in den Kernen ein steiler Anstieg des Stickstoffgehaltes in der mittleren, pharmakologisch praktisch unwirksamen Fraktion bis hin zu einem Maximum bei 14.4% gefunden wurde. Schließt man von dem prozentualen N-Gehalt auf den Proteingehalt ($N \times 6.25$) (45) so ergibt sich für diese Fraktion ein Proteinanteil von 90%. Nach Abtrennung dieser Fraktion müßte eine signifikante Anreicherung des wirksamen Prinzips aus den Kernen zu erzielen sein.

Der Phosphorgehalt wurde nach der Methode von HÖLZL (46) bestimmt. Die phosphorhaltigen Substanzen wurden verascht, die gebildete Orthophosphorsäure durch Zusatz von Ammoniummolybdat in die komplexe Heteropolysäure $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$ übergeführt und diese anschließend mit Ascorbinsäure im sauren Medium zu Molybdänblau reduziert (47). Dieser Komplex wird bei 772 nm photometrisch bestimmt.

Die %-Gehalte steigen, wie der Tabelle 7, S. 32, zu entnehmen ist, mit dem Aschegehalt stark an.

T a b e l l e 7

Phosphorgehalt in den Hauptfraktionen aus den Kernen

Fraktion	0.05 - 0.15%
Fraktion 2	0.11%
Fraktion 3	1.1%
Folgefraktionen bis	1.7%

Isoelektrische Fokussierung

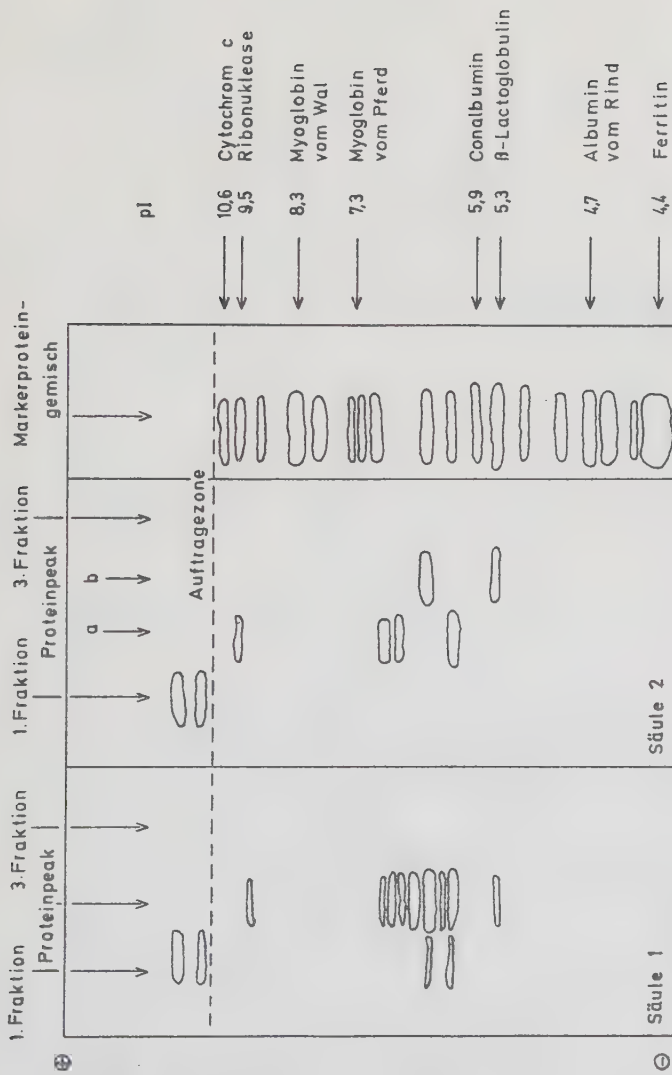
Zur weiteren Charakterisierung der getesteten Fraktionen untersuchten wir diese mit einem elektrophoretischen Verfahren.

Eine moderne Trennmethode mit höchster Auflösung ist die isoelektrische Fokussierung. Die Probenbestandteile werden in einem pH-Gradienten, nach ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI) getrennt. Lineare stabile pH-Gradienten werden erzeugt, indem man dem Träger (Polyacrylamidgel) Ampholyte zusetzt, die sich nach dem Anlegen von Spannung ihrer Ladung entsprechend anordnen. Die Probe wird als Zone auf das Flachbettgel aufgegeben. Geladene Probenbestandteile wandern zur Elektrode mit entgegengesetzter Ladung. Während des Wanderns im pH-Gradienten verringert sich die Nettoladung kontinuierlich. Bei einem pH-Wert, der dem pI der Probe entspricht, wird die Nettoladung Null und das Wandern hört auf. Die Probenbestandteile werden an den betreffenden pI-Werten fokussiert und bilden konzentrierte, enge Zonen.

Die Zonen detektierten wir mit einem Proteinfärbereagenz (Coomassie Brilliant Blau). Wie erwartet, ließ sich die stark proteinhaltige Fraktion gut anfärben. Sie bildete allerdings keine einheitliche Zone, sondern trennte sich in mindestens 9 deutliche und zahlreiche schwach wahrnehmbare Zonen auf, die sich über den gesamten Wanderungsbereich erstreckten.

Wir untersuchten Fraktionen aus 2 verschiedenen Säulentrennungen und verglichen sie mit einem Markerproteingemisch*) (bestehend aus Proteinen von pI 4.4 - 10.65).

*) Proteintestmischung 8, "Serva" Art.-Nr. 39205



Isoelektrische Fokussierung von Kernfraktionen

Abb. 9

K 20 ÜÜ wurde einmal über Sephadex G 50 (Säule 1) und einmal über Sephadex G 100 (Säule 2) getrennt und wie üblich fraktioniert. Bei Säule 2 wurde die Proteinfraction außerdem noch in einen Teil a und Teil b ($MG_a > MG_b$) aufgetrennt.

Die Fraktionen 1 aus beiden Säulen lieferten zwei deutlich anfärbbare Zonen mit einem $pI > 10.65$. Bei Fraktion 1 aus Säule 1 waren außerdem noch zwei Zonen im Bereich von pI 6 nachweisbar. Hier handelt es sich offensichtlich um Verunreinigungen, die durch Überschneidung mit dem Proteinpeak zustande kamen. Die Fraktionen 3 ließen sich nicht mehr anfärben. Dies war aufgrund ihres sehr geringen Stickstoffgehaltes auch nicht zu erwarten.

Interessant war das unterschiedliche elektrophoretische Verhalten der Proteinunterfraktionen a und b. Nachdem diese Fraktionen jedoch pharmakologisch unwirksam waren, untersuchten wir sie nicht weiter.

Aus diesen Beobachtungen können wir folgern, daß die hochmolekulare Fraktion 1 aus den Kernen

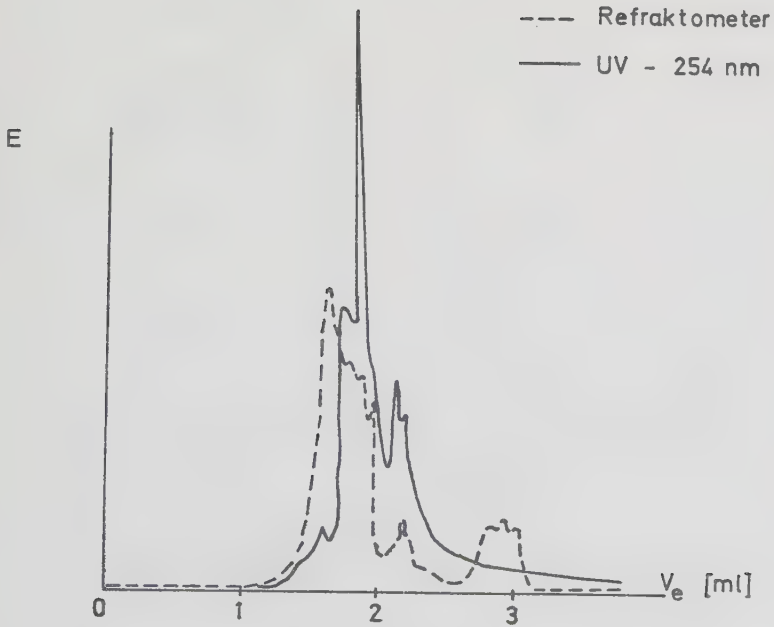
1. nachdem sie so nahe zur Anode gewandert war, aus einem anionischen Hauptanteil besteht, der einen anfärbbaren Proteinrest kovalent gebunden enthält,
2. dieser Hauptanteil, je nach Trennqualität der Säule, mit der bei der Säulentrennung folgenden Proteinfraction verunreinigt sein kann.

Gelpermeationschromatographie

Eine Variante der Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist die Gelpermeationschromatographie (GPC). Bei der GPC werden analog der Gelchromatographie Moleküle nach ihrer unterschiedlichen effektiven Molekülgröße in Lösung getrennt.

GELPERMEATIONSCHROMATOGRAPHIE VON SABAL - FRAKTIONEN

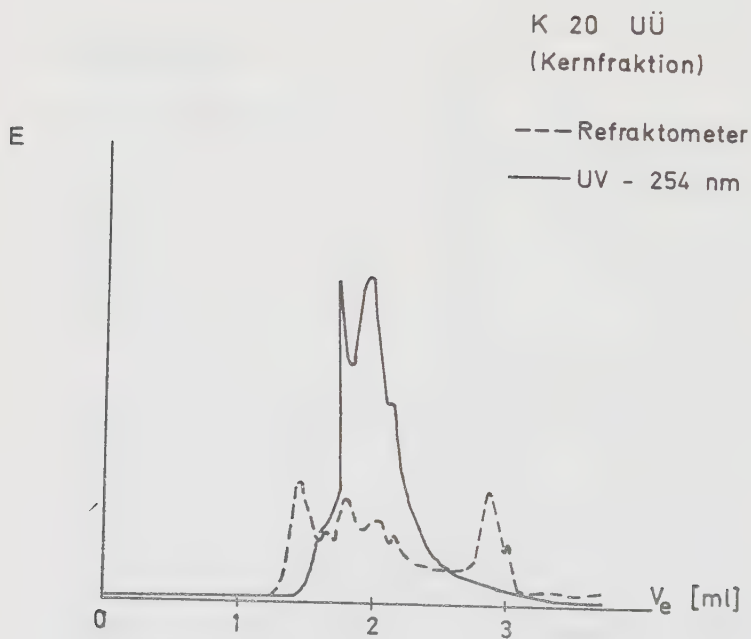
S 20 UÜ
(Schalenfraktion)



Gel: μ - Bondagel E 500/ E 300/ E 125

Abb. 10

GELPERMEATIONSCHROMATOGRAPHIE
VON SABAL - FRAKTIONEN



Gel: μ - Bondagel E 500/ E 300/ E 125

Abb. 11

Das Gelbbett besteht aus porösen Partikeln (in unserem Fall ein veräthertes Kieselgel). Moleküle, die zu groß sind, um in irgendwelche Poren eindringen zu können, werden nicht zurückgehalten und so als erste eluiert (Ausschlußvolumen). Es folgen die etwas kleineren Moleküle, die in einige der Poren eindringen können und schließlich diejenigen, die durch alle Poren zurückgehalten werden.

Wir prüften mit dieser Methode, ob noch eine weitere Auftrennung erzielbar war.

Als Trennsystem verwendeten wir einen Satz von 3 Säulen mit Porengrößen von 125, 200 und 500 Å; dies entspricht einem effektiven Molekulargewichtstrennbereich von 2000 bis 500 000. Als mobile Phase diente eine 50 nanomolare Natriumphosphatlösung. Zur Detektion benützten wir ein UV-Photometer und zusätzlich ein Refraktometer. Die mit UV-254 nm detektierten Chromatogrammbilder wiesen wenig Ähnlichkeit mit denen der Gelchromatographie auf (s. Abb. 10, S. 35 und Abb. 11, S. 36). Die Zahl der Peakspitzen hatte sich zwar erhöht, die Trennung aber nicht verbessert. Das Detektionsschema des simultan detektierenden Refraktometers stimmte - abgesehen von der Intensität der einzelnen Peaks - ungefähr mit dem der UV-Detektion überein. Auffallend war im Kernextrakt bei der Refraktometer-Detektion ein intensiver Anfangs-Peak, der bei der UV-Detektion nicht auftrat. Sowohl im Schalen- als auch im Kernextrakt trat bei der Refraktometer-Detektion im niedermolekularen Bereich jeweils ein neuer Peak in Erscheinung.

Die gravimetrische Bestimmung der vor und nach den UV-detektierten Peaks aufgefangenen Fraktionen ergab kaum wägbare Ausbeuten. Es könnte sich um reine, im UV-Licht nicht absorbierenden Poly- bzw. Oligosaccharidsubstanzen gehandelt haben. Wegen der geringen Menge kamen sie für eine pharmakologische Prüfung nicht in Betracht.

Eine weitere Optimierung des Trennverfahrens durch Erhöhung der Trennbödenzahl, Modifizierung der Porengröße und andere Deri-

vatisierung des Trägersgels wäre theoretisch möglich gewesen, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Wir verwendeten aber die GPC mit etwas geänderten Parametern zur Molekulargewichtsbestimmung später gewonnener Fraktionen (siehe D. 4.3, S. 66).

Aminosäureanalysen

Zur näheren Charakterisierung wurde die Proteinfraction aus den Kernen auf ihre qualitative und quantitative Aminosäurezusammensetzung untersucht und diese mit den frei in Schalen und Kernen vorliegenden Aminosäuren verglichen.

Die Proteinfraction wurde nach salzsaurer Hydrolyse, die freien Aminosäuren in den Wasserextrakten nach Anreicherung über einen Kationenaustauscher direkt im Aminosäureautoanalyser bestimmt.

Insgesamt fanden wir an freien Aminosäuren 0.056%, davon 0.047% in den Schalen und 0.068% in den Kernen. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der untersuchten Fraktionen geht aus Tabelle 8, S. 39, hervor.

T a b e l l e 8
Relative Aminosäurezusammensetzung in Mol%

Aminosäure	Proteinfraktion aus den Kernen	freie Aminosäuren	
		Kerne	Schalen
Lys	8.85	6.40	5.27
His	2.17	0.31	-
Arg	13.94	7.99	2.45
Asp	3.75	3.85	5.28
Thr	1.40	4.41	2.70
Ser	2.63	7.36	6.61
Glu	36.63	7.82	7.03
Pro	2.88	7.03	8.89
Gly	9.96	4.17	1.77
Ala	2.59	29.68	9.13
Cys	7.91	-	-
Val	0.48	6.49	8.00
Met	3.11	0.16	0.30
Ile	0.15	3.82	7.46
Leu	1.35	5.04	10.19
Tyr	2.19	2.75	8.89
Phe	Spur	2.71	16.01

2.4 Prüfung auf Wirkungssteigerung durch künstliche Kontaminierung

Da, wie in Kapitel D. 2.2, S.29, beschrieben, die braun gefärbten Fraktionen K 2 und K 1 d eine höhere ödemhemmende Aktivität zeigten als alle neugewonnenen Folgefraktionen und dies möglicherweise auf sekundäre Reaktionen, etwa vom Typ einer Maillard-Reaktion, zurückzuführen war, versuchten wir eine solche Reaktion künstlich nachzuvollziehen.

Wir erhitzen den gesamten wasserlöslichen Anteil der Methanolfällung aus dem Schalenextrakt (1), eine

S 20 UÜ-(2) und eine K 20 UÜ-Fraktion (3), in wässriger Lösung 10 Stdn. auf dem Wasserbad bei 60°. Bei keiner der Fraktionen trat eine wahrnehmbare Braunfärbung ein. Bei 3 trat nur eine leichte Trübung auf.

Bei der Testung von 1 am Rattenpfoten-Ödem fanden wir eine Hemmung der Ödembildung um 28% bei 0.3 und um 42% bei 3 mg/kg. Dies war gegenüber S 20 UÜ mit 22 bzw. 63% keine Wirksamkeitssteigerung.

2.5 Ergebnis des Isolierungswegs II

Das antiödematöse Prinzip ist in den Schalen- und in den Kernextrakten der Droge zu finden. Sein Molekulargewicht muß aufgrund der Abtrennbarkeit durch Diafiltration über 10 000 liegen. Es ist in eine niedermolekulare und eine hochmolekulare Fraktion auftrennbar. Die Wirksamkeit der Fraktionen aus den Kernextrakten und den Schalenextrakten ist in etwa gleich, wobei jeweils die höhermolekulare Fraktion die stärkste Wirksamkeit zeigte.

Der in den Kernextrakten enthaltene Proteinanteil im Molekulargewichtsbereich von ca. 10 000 bis 20 000 zeigt keine nennenswerte Wirkung. Seine Abtrennung müßte somit zu einer signifikanten Wirksamkeitssteigerung sowohl der Gesamtfraktion, als auch besonders der höhermolekularen Fraktion führen. Außerdem sollte eine zusätzliche Steigerung der Wirkung durch schärfere Auftrennung der beiden hochwirksamen Fraktionen erreichbar sein. Als mögliche Verfahren kamen hierfür die Diafiltration bei einer anderen Trenngrenze oder bei Kenntnis der (Teil-) Strukturen die Affinitätschromatographie in Frage.

3.0 Abtrennung der Proteinfraktion (Isolierungsweg III)

Eine der verbreitetsten Proteinfällungsmethoden ist die Fällung mit Trichloressigsäure. Werden jedoch Hemicellulosen saurem Milieu ausgesetzt, kann sehr leicht eine Hydrolyse der glykosidischen Bindungen eintreten (48). Weitaus schonender ist die Entfernung der Proteine nach

dem SEVAG-Verfahren (49), indem man die wässrige Lösung mit einem Gemisch aus Chloroform und Butanol oder Amylalkohol schüttelt. Nach Zentrifugieren der entstandenen Emulsion befinden sich die denaturierten, ausgefällten Proteine in der gelartigen Zwischenphase zwischen Wasser und Chloroform. Bei diesem Verfahren werden pro Ausschüttelung aber nur geringe Mengen an Proteinen entfernt, so daß man den Vorgang mehrmals wiederholen muß, was mit einem gleichzeitigen Verlust an Polysacchariden einhergeht. Eine Verbesserung dieses Verfahrens ist das von GESSLER et al. (50) vorgeschlagene modifizierte SEVAG-Verfahren. Anstelle des Chloroform-Butanol-Gemisches verwendet man Trifluortrichloräthan (Genetron 113). Das Ausschütteln wird durch 10minütiges Homogenisieren mit einem Hochgeschwindigkeitshomogenisator ersetzt.

Eine andere, sehr elegante Methode ist das Verdauen des Proteinanteils (40) mit universellen proteolytischen Enzymen. Die freigesetzten Aminosäuren und Peptidbruchstücke werden anschließend durch Dialyse abgetrennt.

Wir versuchten eine Abtrennung des Proteinanteils von K 20 UÜ-Fractionen zunächst nach dem SEVAG-Verfahren. Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und mit Chloroform, dem 20% n-Butanol oder Amylalkohol zugesetzt waren, geschüttelt. Die Emulsionen wurden durch Zentrifugieren zerstört und die Wasserphase abgehebert.

Mit ihr wurde das ganze noch 2 - 4mal wiederholt. Zur Kontrolle wurden die vereinigten Gel- (= Fraktion A) und die verbleibenden Wasserphasen (= Fraktion B) auf Filterpapier aufgetupft und mit der Coomassie-Brillant-Blau G 250-Färbemethode geprüft. Bei jedem Versuch färbte sich Fraktion B (die "Polysaccharidfraktion") kräftiger als Fraktion A (die "Proteinfraktion") an. Um auszuschließen, daß dies Konzentrationsbedingt war, führten wir die Testung mit den gefriergetrockneten Fractionen durch. Beide Flecken zeigten gleiche Farbtintensität. Da die Möglichkeit bestand, daß das wirksame Prinzip einen Peptidanteil kovalent gebunden enthielt, bestimmten wir die Ödemhemmung.

Wie der Rattenpfortentest ergab, war die Ödemhemmung bei Fraktion A noch wesentlich ausgeprägter als bei Fraktion B (s.Tab. 9, S.42).

T a b e l l e 9

Hemmung der Ödembildung in %, 3 Stdn. nach
Ödemprovokation

Dosierung i.v.	0.6 mg/kg	3.0 mg/kg
Fraktion A	38	65
Fraktion B	0	13

Eine Wirksamkeitssteigerung gegenüber der Ausgangsfraktion K 20 UÜ war aber nicht erreicht worden.

In einem anderen Versuchsansatz versuchten wir den Proteinanteil durch enzymatische Verdauung mit der universell verwendbaren Pronase aus *Streptomyces griseus**) zu entfernen. Mit der anschließenden Diafiltration des Reaktionsgemisches ließen sich 58% der Ausgangsmenge durch eine Membran mit der Ausschlußgrenze MG 10 000 abtrennen.

Ausgangsfraktion K 20 UÜ und neu gewonnene Fraktion K 12 H wurden über Sephadex G 50 chromatographiert. Beim Vergleich der Chromatogrammbilder (Abb. 12 und 13, S. 43) erkennt man eine deutliche Veränderung. Die erste, hochmolekulare Fraktion (Peak 1) ist zwar, bei gleicher Probenauftragmenge, flächenmäßig in etwa gleich geblieben, ihr Anteil hat sich aber bei K 12 H, bezogen auf die Auswaage aller Fraktionen von 15.8% auf 33.1% mehr als verdoppelt. Die mittlere Proteinfraction (Peak 2) ist nahezu ganz verschwunden, während die Fläche im niederen Molekulargewichtsbereich deutlich zugenommen hat. Bezogen auf die Auswaage enthielt dieser große Peak jedoch nur 31% der Gesamtmenge. Dieses unterschiedliche Verhältnis zwischen Fläche und Auswaage erklärt sich durch die unterschiedliche Absorption dieser Fraktionen bei 254 nm. Während der Stickstoffgehalt in der Proteinfraction ursprünglich am höchsten (12.02%) war, hatte er sich nach der enzymatischen Verdauung zur niedermolekularen Fraktion hin verschoben (9.94%).

*) Pronase, Boehringer Mannheim

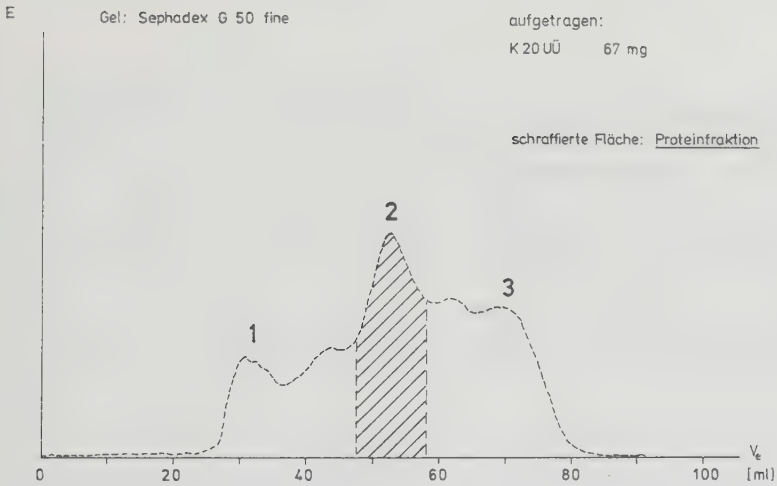


Abb. 12

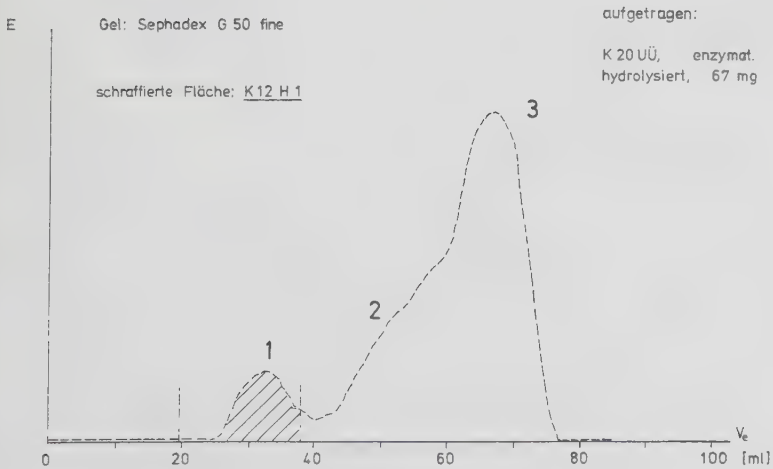


Abb. 13

Dies ist nur so zu erklären, daß sich in diesem Bereich noch größere Proteinbruchstücke angesammelt haben, die offenbar der Verdauung widerstanden hatten (s.Tab. 10).

T a b e l l e 10

Stickstoffgehalt der durch Gelchromatographie aufgetrennten Unterfraktionen der K 20 UÜ-Ausgangsfraction und der enzymatisch verdauten Fraction

	hochmolek. Fraktion	mittlere Fraktion	niedermolek. Fraktion	Gesamt- fraktion
K 20 UÜ	2.46	12.02	1.22	3.70
K 12 H	1.38	2.30	9.94	3.95

Nach dem enzymatischen Abbau von K 20 UÜ ließen sich insgesamt 58% der Ausgangsfraction durch eine Membran der Trenngrenze bei MG 10 000 diafiltrieren. Sollte sich unsere Hypothese, daß das pharmakologisch wirksame Prinzip ein Molekulargewicht von über 10 000 hat und nicht im Proteinanteil liegt, bestätigen, müßte die Aktivität der neu gewonnenen Fraction mindestens doppelt so hoch sein.

T a b e l l e 11

Ergebnisse der pharmakologischen Prüfung:

K 20 UÜ	3 mg/kg i.v.:	64%
K 12 H	1 mg/kg i.v.:	56% und 74%
K 12 H	1 mg/kg i.v.:	68% und 76%
1.Unterfraktion		

bei jedem Wert $p < 0.001$

Aus den Werten der Tabelle 11 kann man letztlich eine etwa dreifache Anreicherung des wirksamen Prinzips gegenüber der Ausgangsfraction ablesen. Das Ergebnis lag aber immer noch

unter dem der Fraktion K 2 (75% bei 0.6 mg/kg). Es war jedoch ein weiterer Beweis dafür, daß die Proteinfraktion nicht das wirksame Prinzip sein kann.

UV-Spektren der Einzelfractionen

Da Proteine infolge ihres Gehaltes an aromatischen Aminosäuren im UV-Spektrum ein Maximum um 280 nm aufweisen, kann man durch Aufnahme eines UV-Spektrums auf einfache Weise einen Hinweis auf ihre Anwesenheit in Polysaccharidgemischen erhalten. Wie erwartet, nahm mit steigendem Proteinanteil die Extinktion bei 280 nm zu. Aus der Intensität dieses Maximums, im Verhältnis zur Absorption bei der Detektormeißwellenlänge bei 254 nm, konnten wir somit direkt auf die pharmakologische Wirksamkeit von Fraktionen schließen, die wir aus den Kernen isoliert hatten (s.Tab. 12).

T a b e l l e 12

Abhängigkeit der Ödemhemmung von der Extinktion bei 280 nm

Fraktion	Detektorwellen- länge 254 nm	E 1 % 1 cm	
		Maximum bzw. Schulter 276 nm	Ödemhemmung % bei 3 mg/kg
K 20 UÜ	4.10	4.60	64
hochmolek. Unterfraktion	6.95	6.95	70
Proteinfraktion	5.70	7.40	27
niedermol. Unterfraktion	3.60	3.15	56
K 12 H	6.20	5.35	74*)

*) Dosierung 1 mg/kg !

Bei einer Simultandetektion bei 254 und 280 nm sind demnach die proteinhaltigen Fraktionen sofort zu erkennen und gegebenenfalls zu eliminieren.

Berechnung des Molekulargewichtes der Proteinfraktion

Aus den Elutionsvolumina globulärer Proteine bei ihrer Auftrennung an Sephadex-Gelen, haben DETERMANN und MICHEL (51) eine Beziehung zu deren Molekulargewicht hergestellt. Den Berechnungen legten sie folgende Gleichungen zugrunde:

$$\text{für Sephadex G 50: } \lg MG = 5.415 - 0.864 \cdot (V_e/V_o)$$

$$\text{für Sephadex G 100: } \lg MG = 5.941 - 0.847 \cdot (V_e/V_o)$$

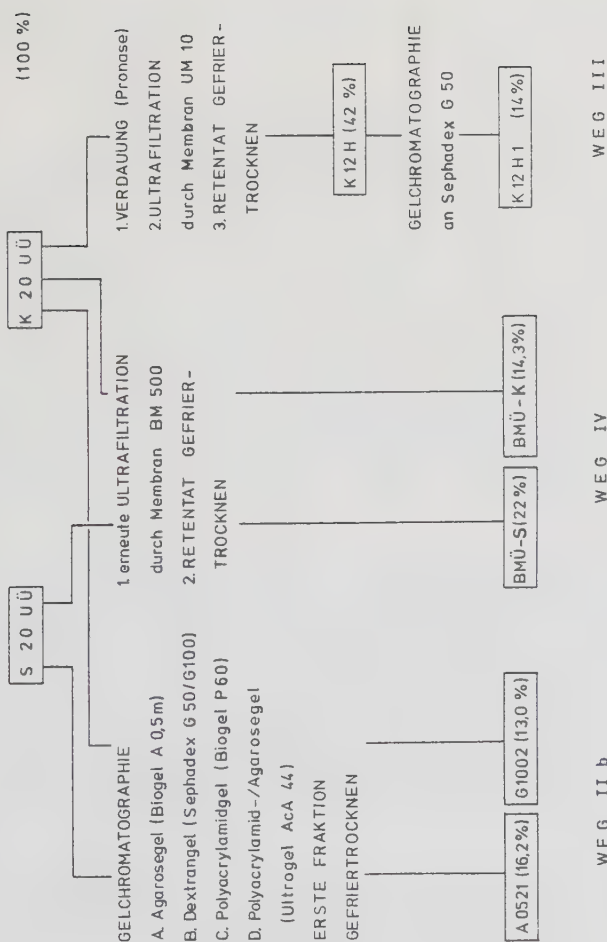
Dabei ist V_e das Elutionsvolumen des zu berechnenden Proteins und V_o das Außenvolumen des Gelbettes.

Wir setzten die experimentellen Daten aus 11 unserer Säulentrennungen in diese Gleichungen ein. Daraus errechnet sich für unsere Proteinfraktion ein mittleres Molekulargewicht von 10 000.

Durch die Abtrennung der Proteinfraktion aus dem wasserlöslichen Anteil der Methanolfällungen aus den Kernextrakten erreichten wir für die so gewonnene Fraktion eine um mindestens den Faktor 3 verbesserte Hemmung des Rattenpfoten-Ödems. Eine weitere Steigerung war auch nicht durch Auftrennen mit Hilfe verschiedener gelchromatographischer Techniken zu erzielen, da sich die einzelnen Fraktionen immer noch zu stark überschnitten. Die hohe Wirksamkeit der Fraktionen K 2 und K 1 d war somit nicht wieder erreicht worden.

Nachdem wir für die Proteinfraktion ein Molekulargewicht um 10 000 errechnet hatten, bedeutete dies, daß diese Fraktion bei der vorausgegangenen Diafiltration durch eine Membran mit der Trenngrenze 10 000 gerade noch zurückgehalten worden war. Für die hochmolekulare Fraktion, von der wir uns die höchste Wirksamkeit erwarteten, schlossen wir aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens auf ein Molekulargewicht von über 50 000.

Eine weitere Anreicherung der hochmolekularen Fraktion sollte durch eine vollständige Abtrennung des Proteinanteils mit



Schema 3

Hilfe einer Ultrafiltrationsmembran mit einer Trenngrenze bei 50 000 erreichbar sein.

Eine zusammenfassende Übersicht über die eingeschlagenen Isolierungswege gibt das Schema 3, S. 47, wieder.

4.0 Erneute Diafiltration (Isolierungsweg IV)

Die Retentate nach Isolierungsweg IIa (s. Schema 2, S. 22), wurden erneut durch eine Ultrafiltrationsmembran der Trenngrenze bei MG 50 000 diafiltriert. Retentate und Dialysate wurden gefriergetrocknet. Aus den Schalenfraktionen verblieben 21.6% im Retentat, aus den Kernfraktionen 14.3%. Dies waren, bezogen auf die Ausgangsmenge an Schalen, bzw. Kernen 0.16%, bzw. 0.025%. Die Kernfraktion (Bez.: BMÜ-K) ließ sich immer noch schwach mit Coomassie-Brillant-Blau G 250 anfärben. Dies rührte entweder von einer Restverunreinigung durch Proteine oder von kovalent gebundenen Peptidresten her.

Die Retentate wurden zur Kontrolle über Sephadex G 50 fine, Sephadex G 100, Biogel P 60 und Sepharose CL-6B (typischer Fraktionierungsbereich für Polysaccharide von MG 10^5 - 10^6) chromatographiert. Von jedem der verwendeten Gele wurde nur ein einziger, nahezu symmetrischer Peak aufgelöst. Er befand sich, außer bei Sepharose CL-6B, immer im Ausschlussvolumen des jeweiligen Trenngels. Daraus war auf ein Molekulargewicht dieser Fraktion von mindestens 100 000 zu schließen.

Abb. 14 und 15, S. 49, geben je ein Chromatogrammbild für eine Schalen- (BMÜ-S) und eine Kernfraktion (BMÜ-K) wieder. Beide Fraktionen bestehen fast ausschließlich aus Peak 1.

Die Schalenfraktion löste sich nahezu klar. Die Kernfraktion dagegen lieferte, in Wasser bei Raumtemperatur gelöst, eine Trübung.

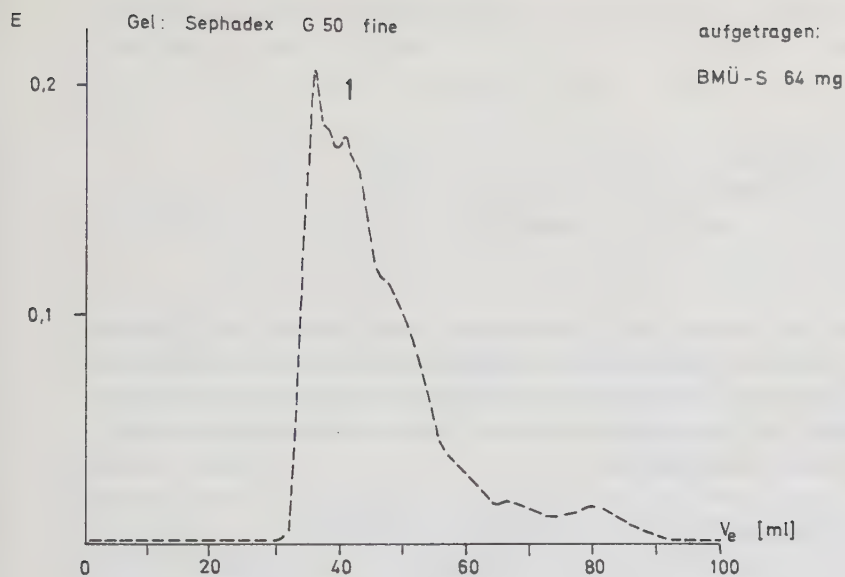


Abb. 14

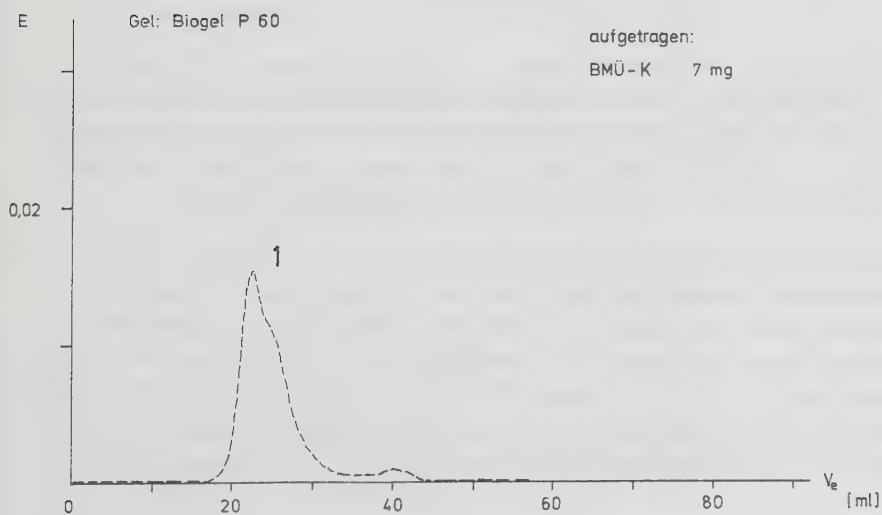


Abb. 15

Der Rattenpfotentest ergab für die Fraktion BMÜ-S folgende Werte:

T a b e l l e 13

Dosierung	mg/kg i.v.	0.1	0.5	1.0
Ödemhemmung	%	7	25	62
3 Std. nach Provokation				

Die Ausgangsfraktion S 20 UÜ zeigte eine Hemmung von 63% bei einer Dosierung von 3 mg/kg i.v.. Dies bedeutet, daß das wirksame Prinzip etwa um den Faktor 3 angereichert worden war und damit in etwa der enzymatisch behandelten Fraktion aus den Kernen entsprach.

Wesentlich wirksamer waren die Kernfraktionen:

T a b e l l e 14

Dosierung	mg/kg i.v.	0.1	0.5	1.0
Ödemhemmung	%	65	74	87
3 Std. nach Provokation				

Die Werte für die Kernfraktion fielen wie erwartet aus. Gegenüber der Ausgangsfraktion K 20 UÜ, die bei einer Dosierung von 3 mg/kg die Ödembildung um 64% hemmte, war dies eine Anreicherung des wirksamen Prinzips um den Faktor 30!

MÜNZING (32) hatte im gleichen Testmodell mit seinem hoch angereicherten Wirkprinzip aus einer Sojaacetonfällung eine Ödemhemmung von 34.2% bei einer Dosierung von 0.1 mg/kg erreicht. Geht man davon aus, daß für eine Verdopplung der Wirkung eine 5 - 10fach höhere Dosierung nötig ist, so bedeutet dies, daß das Sabalwirkprinzip noch 5 - 10mal wirksamer ist, als das der Sojabohnen.

Zur Eingrenzung des pharmakologischen Wirkungsmechanismus wurde BMÜ-K auch an anderen Testmodellen untersucht. (Beschreibung siehe pharmakologischer Teil, Kapitel F. 2.1 und F. 2.2, S. 80ff.).

4.1 Übersicht über die Dosis-Wirkungs-Beziehung pharmakologisch signifikant wirksamer Sabalfractionen

Abb. 16, S. 52, gibt die schrittweise Anreicherung des Wirkprinzips aus Sabalkernen wieder. Während die Dosis-Wirkungsgeraden bei den noch wenig angereicherten Fraktionen noch mit einer gut erkennbaren Dosis-Wirkungsabhängigkeit sehr steil verlaufen, zeigen die Dosis-Wirkungsgeraden bei den hochangereicherten Fraktionen einen sehr flachen Verlauf im supramaximalen Bereich. Stellt man sich den tatsächlichen Dosis-Wirkungsverlauf als sigmoide Kurve vor, dann befinden sich die Fraktionen K 15 *) und K 1 im Bereich um den Wendepunkt und die Fraktionen K 2 und BMÜ-K im oberen, schon asymptotisch verlaufenden Bereich der Kurve. Eine Verlängerung nach niedrigeren Dosierungen würde dann in den steil abfallenden und schließlich in den unteren asymptotisch verlaufenden Bereich der Kurve übergehen. Dieser Bereich wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr getestet.

Der Dosis-Wirkungsverlauf der hochwirksamen Fraktionen läßt auf jeden Fall auch unterhalb der getesteten Dosierungen noch eine signifikante ödemhemmende Wirkung erwarten.

*) eine Fraktion aus Isolierungsweg I mit einem sehr großen Anteil an niedermolekularen Verunreinigungen.

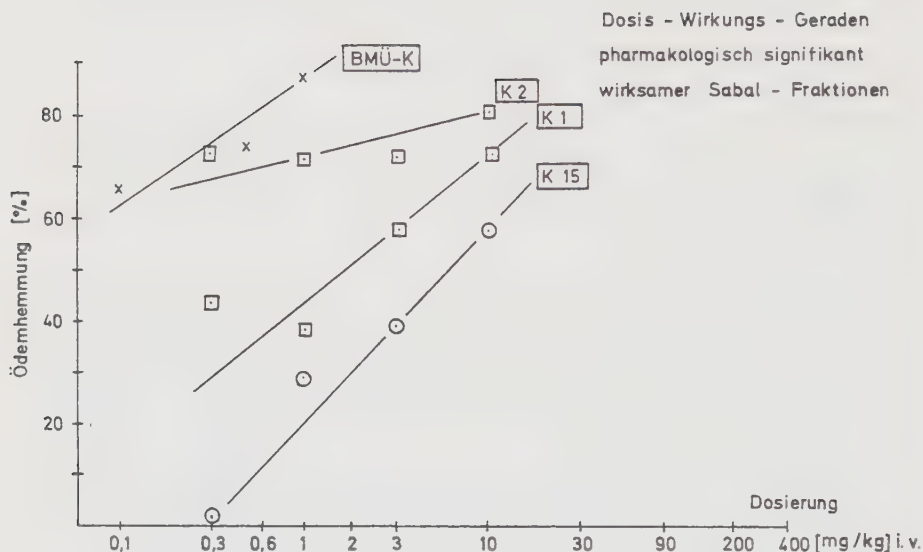


Abb. 16

4.2 Analyse der BMÜ-S-Fraktion (Schalen-Fraktion)

2 Proben von BMÜ-S-Fractionen wurden auf ihre Elementarzusammensetzung untersucht. Probe 2 war aus Probe 1 durch weitere Reinigung über Sephadex G 50 gewonnen worden. Beide waren frei von Stickstoff, Schwefel und Phosphor. Errechnet man aus der später ermittelten Zuckerzusammensetzung die Elementarzusammensetzung, so ergeben sich die Werte der Spalte 3 (Tab. 15). Der prozentuale CHO-Anteil der Probe 2 betrug 89%. Ein Teil des noch fehlenden %-Anteils dürfte aus den an Uronsäuren gebundenen Metallionen bestehen.

Ergebnis:

T a b e l l e 15

Prozentuale Elementarzusammensetzung von BMÜ-S-Fractionen

	Probe 1	Probe 2	theor. Werte
C	36.97	39.59	43.29
H	4.77	5.12	5.94
O	nicht best.	44.32	50.66

Hydrolyse und Neutralzuckerbestimmung

Zur Hydrolyse von Polysacchariden gibt es in der Literatur eine Vielzahl von Methoden. Die meisten arbeiten mit Mineralsäuren und Hydrolysezeiten von bis zu 20 Stdn.

Im Gegensatz dazu wird von FENGEL et al. (52) eine Hydrolyse mit Trifluoressigsäure beschrieben, die nur 1 - 2 Stdn. erfordert. Sie hat gegenüber den Hydrolyseverfahren mit Mineralsäuren folgende Vorteile:

1. Durch die kurze Hydrolysezeit bei der TFE-Methode wird verhindert, daß die einzelnen Zucker zu lange konzentrierten Säuren ausgesetzt sind und dadurch weiterreagieren können.
2. Da die Trifluoressigsäure nach beendeter Hydrolyse nur abgedampft zu werden braucht, kann die Neutralisierung wegfallen. Neutralisierung mit Bariumhydroxid kann zu Isomerisierungen führen. Bei der Neutralisation mit Ionenaustauschern ist mit Verlusten zu rechnen.

Wir hydrolysierten unsere Fraktionen 3 Stdn. mit 1 N-Trifluoressigsäure oder 1 Stde. mit 2 N-Trifluoressigsäure unter Sieden am Rückfluß. Die Hydrolyselösung wurde am Rotationsverdampfer abgezogen bis der Rückstand trifluoressigsäurefrei war. Die freien Neutralzucker wurden mit dem Zuckeranalysator qualitativ und quantitativ bestimmt.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Neutralzucker nach KESLER (53) als Boratkomplexe über eine stark basische Ionenaustauschersäule in einem Boratpuffergradienten aufgetrennt und nach der Elution mit Orcin/Schwefelsäure umgesetzt werden. Der entstandene gelbrote Farbkomplex (54) wird bei seinem Absorptionsmaximum (420 nm) photometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 16 angegeben:

T a b e l l e 16

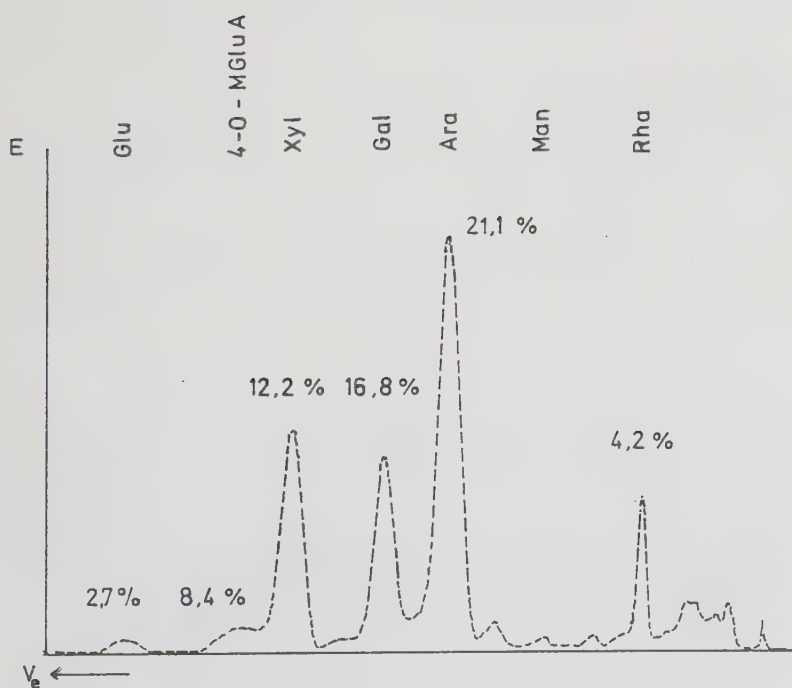
Rhamnose	4.2%	Xylose	12.2%
Mannose	1.0%	4-O-Methyl-	
Arabinose	21.1%	Glucuronsäure	8.4%
Galactose	16.8%	Glucose	2.7%

Insgesamt entfielen 66.4% (vergl. auch Abb. 17, S. 55) auf den Zuckeranteil. Unsubstituierte Uronsäuren wurden bei diesem Versuchsaufbau nicht erfaßt. Glucose wurde zur Kontrolle außerdem auch noch enzymatisch nach der Hexokinase-Methode bestimmt. Der Wert deckt sich mit dem des Zuckeranalysators. Anschließend haben wir das Hydrolysat auch dünnschichtchromatographisch untersucht. Im Fließmittelsystem Isopropanol-Pyridin-Wasser (6:2:2) über Cellulose ließen sich nach Detektion mit Anilinphthalat deutlich die Neutral-Zucker Xylose, Arabinose und Galactose, sowie Galacturonsäure nachweisen (s. Abb. 18, S. 56). Die übrigen durch den Autoanalyser detektierten Zucker waren hier wegen ihrer relativ geringen Konzentration nicht mehr nachweisbar.

Den Gesamturonsäuregehalt bestimmten wir über die Carbazolreaktion nach DISCHE (55,56), modifiziert nach BITTER und MUIR (57). Diese Methode hat gegenüber der ursprünglichen die Vorteile größerer Empfindlichkeit, besserer Reproduzierbarkeit und geringerer Störanfälligkeit durch Chloridionen und Oxidantien. Als Standard verwendeten wir, wie BITTER und MUIR,

ZUCKERCHROMATOGRAMM VON BMÜ-S

(hydrol. m. 1 N-Trifluoressigsäure)



Ausgangsmenge BMÜ-S: 21 mg

Biotronik ZA 5100

Glucuronsäurerelacton. Aus zwei BMÜ-S-Proben fanden wir die Werte 24.4% und 26.9%, was einen Mittelwert von 25.7% ergibt. O-Methyl-Uronsäuren können unter diesen Bedingungen nicht zu dem Reaktionszwischenprodukt 5-Carboxy-2-formylfuran dehydriert werden und werden somit nicht miterfaßt.

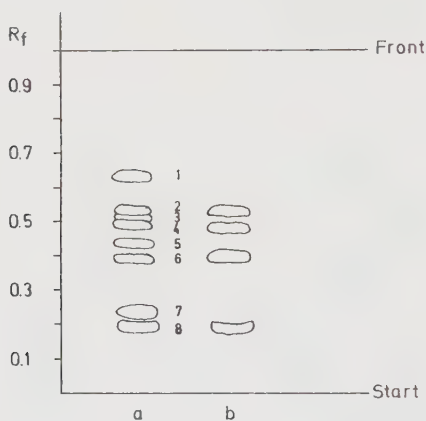


Abb. 18

Zucker-DC eines BMÜ-S-Hydrolysates

1 = Rhamnose

5 = Glucose

2 = Xylose

6 = Galactose

3 = Mannose

7 = Glucuronsäure

4 = Arabinose

8 = Galacturonsäure

a = Testsubstanzen

b = Analyse

Fließmittel: Isopropanol-Pyridin-Wasser (6:2:2)

Adsorbens: Cellulose-Fertigfolien Merck

Detektion: Anilinphthalat-Reagenz

Zur Bestätigung der dünnschichtchromatographisch gefundenen Galacturonsäure silylierten wir das Hydrolysegemisch mit TMSi-S-Universälreagenz ^{*)}. Die Silyläther verglichen wir gaschromatographisch mit authentischer persilylierter Galacturonsäure. Wie aus Abb. 19, S. 58, hervorgeht, konnte die Galacturonsäure eindeutig bestätigt werden.

Beim Veraschen von BMÜ-S wurde ein Rückstand von 4.96% bestimmt. Dies war in etwa die Hälfte der Asche der Ausgangsfraktion S 20 UÜ (10.5%).

In den BMÜ-S-Fractionen haben wir direkt Natrium und Kalium flammenphotometrisch, Calcium sowohl flammenphotometrisch, als auch komplexometrisch und Magnesium nur komplexometrisch bestimmt.

Die bei der Doppelbestimmung gefundenen Werte differierten nur geringfügig voneinander. Alle Werte lagen im Bereich von 0.14 bis ca. 1.0% (s.Tab. 17).

T a b e l l e 17

	K	Na	Ca		Mg
Bestimmungsmethode	a	a	a	b	b
Gehalt in %	0.145	0.188	0.90	0.97	0.83

a) flammenphotometrisch, b) komplexometrisch

Interessanterweise bilden Calcium und Magnesium die Hauptmenge der offenbar an die Uronsäuren gebundenen Ionen.

^{*)} Firma Serva, Heidelberg (Art.-Nr. 36 559).

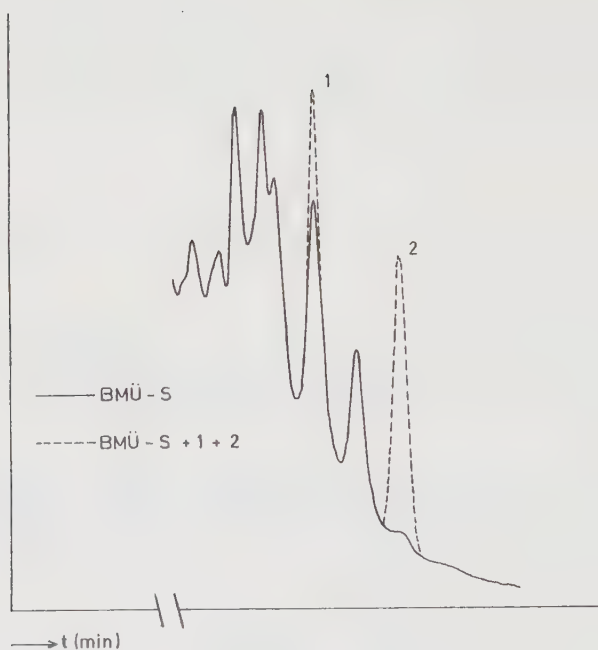


Abb. 19

Überlagerungs-GC eines BMÜ-S-Hydrolysates mit Galaturonsäure (1) und Glucuronsäure (2), silyliert mit TMSi-S-Universalreagenz

Temperaturprogramm: 140 - 210°C, 4°C/min

Säule: UCCW 982, 10% auf Chromosorb W AW DMCS 80-100 mesh

4.3 Analyse der BMÜ-K-Fraktion (Kernfraktion)

Analog wurden auch die entsprechenden Fraktionen der Kerne analysiert.

T a b e l l e 18

Elementarzusammensetzung von BMÜ-K-Fraktionen

	Ausgangsf. K 20 UÜ	Probe 1	Probe 2	Probe 3	theor.Werte
N	3.70	1.66	Spur	2.27	2.26
C	33.6	41.46	41.10	39.98	43.49
H	5.11	5.52	5.21	5.30	5.98
O	-	-	-	46.64	-

- nicht bestimmt

Die Proben 1, 2 und 3 stellen parallel diafiltrierte BMÜ-K-Fraktionen dar.

Die theoretischen Werte wurden aus der später ermittelten Zuckerzusammensetzung von Probe 3 und der Elementarzusammensetzung einer hoch angereicherten Proteinfraction hochgerechnet.

Gegenüber der Ausgangsfraction (K 20 UÜ) hatte sich der Stickstoffgehalt deutlich verringert, ohne jedoch ganz zu verschwinden. Der Kohlenstoffgehalt lag sehr nahe bei dem errechneten Wert für ein reines Polysaccharid, bzw. ein Peptidoglycan. Nicht sicher geklärt werden konnte, ob der verbliebene Stickstoffanteil zu einem nicht abgetrennten Protein oder einem kovalent gebundenen Peptidrest gehörte.

Die BMÜ-K-Fraktionen wurden, wie bei den BMÜ-S-Fraktionen beschrieben, hydrolisiert und auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung untersucht.

Die Zuckerzusammensetzung (s.Tab. 19 und Abb. 20, S. 61) unterschied sich deutlich von der der BMÜ-S-Fraktion. Hauptkomponenten waren Galactose und Arabinose. Xylose ist nur zu einem geringen Anteil vorhanden. Dünnschicht-chromatographisch waren Xylose und auch Uronsäuren kaum noch nachweisbar.

Ergebnisse:

T a b e l l e 19

Rhamnose	0.5%	Xylose	1.4%
Mannose	0.5%	4-O-Methyl-	
Arabinose	18.7%	Glucuronsäure	0.5%
Galactose	38.4%	Glucose	0.5%
Insgesamt:	60.5%	(siehe auch Abb. 20, S. 61)	

Nach der bei den BMÜ-S-Fractionen beschriebenen Methode erhielten wir aus zwei Proben 13.7 und 12.9% Uronsäuren. Durch Umrechnen auf relative molare Zuckerzusammensetzung erhält man folgendes Verhältnis für die einzelnen Zucker-komponenten:

Rha : Man : Ara : Gal : Xyl : 4-O-M-GluA : Glu : Urons.
 1 : 1 : 45 : 77 : 3 : 1 : 1 : 25

und zum Vergleich für die BMÜ-S-Fraktion:

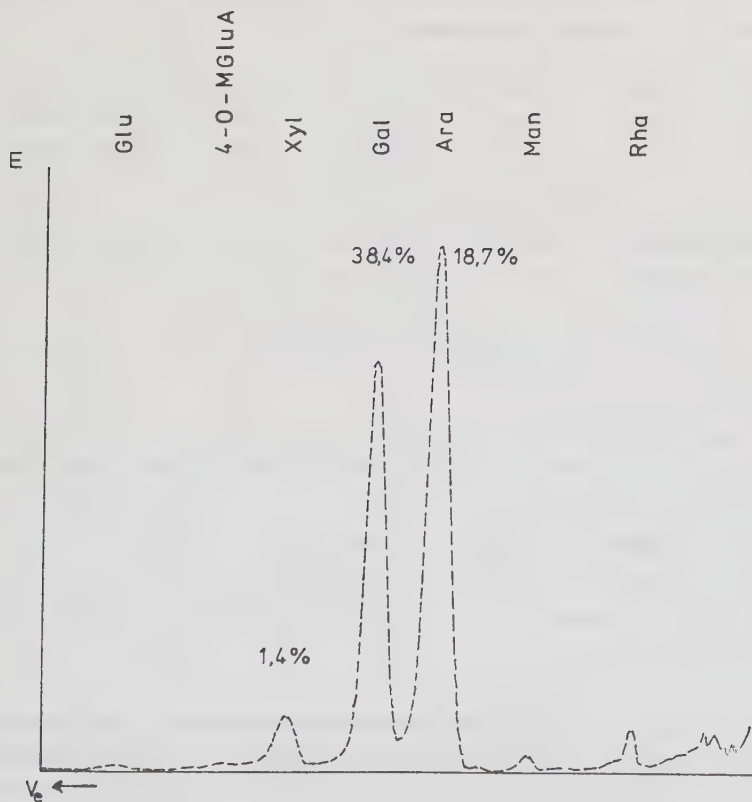
5 : 1 : 28 : 19 : 16 : 8 : 3 : 25

Daraus ergibt sich das Verhältnis Gesamtneutralzucker zu Gesamturonsäuren als:

BMÜ-K 128 : 26 ≈ 5 : 1
 BMÜ-S 72 : 33 ≈ 2 : 1

ZUCKERCHROMATOGRAMM VON BMÜ-K

(hydrol. m. 2 N-Trifluoressigsäure)



Ausgangsmenge BMÜ-K: 21 mg

Biotronik ZA 5100

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen BMÜ-K und BMÜ-S ist damit der Gehalt an Uronsäuren. Der hohe Uronsäuregehalt der Schalenfraktion könnte von miterfaßten Pektinanteilen herühren. Native Pektine sind in der Primärwand der Zellwände mit anderen Strukturelementen, wie z.B. Hemicellulose zum großen Teil kovalent gebunden (58).

Die Veraschung von BMÜ-K-Proben (wie unter 2.3) ergab Werte zwischen 3.35 und 4.96% (Mittelwert: 4.17%). Dies war weniger als die Hälfte der Ausgangsfraktion K 20 UÜ, für die Werte von 11.7 bis 11.9% gefunden worden waren.

Die Metallionen-Bestimmung ergab die in der Tabelle 20 angegebenen Werte:

T a b e l l e 20

	K	Na	Ca		Mg
Bestimmungsmethode	a	a	a	b	b
K 20 UÜ	3.15	0.40	0.80	0.86	2.73
Gehalt in %					
BMÜ-K	0.28	0.16	0.78	0.79	0.32

a) flammenphotometrisch, b) komplexometrisch

Geht man davon aus, daß die BMÜ-K-Fraktion 13% nicht veresterter Uronsäuren enthält, und diese ausschließlich mit den Mg^{++} - und Ca^{++} -Ionen Salze bilden, so ergäbe sich folgende Rechnung:

192 g (= 1 Mol) Uronsäure binden	20.0 g Ca oder 12.2 Mg
13 g Uronsäure binden	1.352 g Ca oder 0.826 g Mg

Wir fanden 0.79% Ca und 0.32% Mg. Daraus würde folgen, daß Ca und Mg in etwa äquimolaren Mengen die Kationen der Uronate stellen.

Prüfung auf Aminosucker

Um auszuschließen, daß der verbliebene Stickstoffgehalt in den BMÜ-K-Fractionen auf Aminosucker zurückzuführen ist, chromatographierten wir das für die Zuckeranalyse erhaltene Hydrolysat über Kieselgelfertigplatten und detektierten mit MORGAN-ELSONS-Reagenz (34). Zum Vergleich trugen wir authentisches D-Glucosamin, sowie D-Galactosamin mit auf. Keine unserer Proben lieferte einen positiven Hinweis.

Proteinbestimmung nach LOWRY (59)

Beim Vergleich der Elementaranalysen einzelner BMÜ-K-Fractionen fällt der schwankende N-Gehalt auf. Diese Tatsache spricht nicht für einen kovalent gebundenen Peptidanteil, sondern eher für noch mit in der Fraktion vorhandene höhermolekulare Proteinreste, die nicht vollständig herausdiafiltriert werden konnten.

Beim Versuch, die Stickstoffwerte mit den Proteingehalten, bestimmt nach LOWRY (59), zu korrelieren, fanden wir folgendes Ergebnis:

	N-Gehalt	Protein nach LOWRY
K 20 UÜ-Fraktion	3.7 - 6.2%	10.6 - 33.3%
BMÜ-K-Fraktion	0.15- 2.3%	4%

Nach dem N-Gehalt wäre ein etwas höherer Proteingehalt zu erwarten gewesen. Diese Diskrepanz läßt sich möglicherweise teilweise durch den unterschiedlichen Tyrosingehalt im Sabalprotein (3%) und Standardprotein (6%) erklären. Tryptophan wurde in Sabal nicht nachgewiesen und ist im Standardprotein nur zu ca. 0.1% enthalten.

Die Proteinbestimmung nach LOWRY bestätigte nochmals die nicht gelungene Abtrennung des Proteinanteils nach der SEVAG-Methode (siehe Kapitel 3.0, S. 41). Im "Polysaccharidanteil" fanden wir 35.2%, im "Proteinanteil" jedoch nur 27.6% Protein.

Aminosäurebestimmung aus K 1 d

Fraktion K 1 d (siehe Isolierungsweg I), die weitestgehend den BMÜ-K-Fractionen entspricht, wurde, wie unter Kapitel 2.3, S.38, beschrieben, auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin untersucht und die gefundenen Daten mit anderen in der Literatur beschriebenen carrageeninödemhemmenden Fraktionen verglichen (siehe Tab. 21, S. 65).

Aus der Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils der hochwirksamen Fraktion K 1 d und der aus K 20 UÜ über Sephadex Gelchromatographie angereicherten Proteinfractionen a und b, schließen wir, daß die angereicherten Proteinfractionen mit dem in der hochmolekularen Fraktion K 1 d verbliebenen Proteinanteil nicht identisch ist. Eine Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung mit dem in der Literatur beschriebenen Achillea-Proteoglycan, bzw. Soja-Proteoglycan, läßt sich ebenfalls nicht erkennen.

Die ersten 3 Fraktionen zeigen in etwa das gleiche gelchromatographische Verhalten. K 1 ist eine Mischfraktion aus höher- und niedermolekularen Polysacchariden, Proteoglycanen und Proteinen.

T a b e l l e 21

Qualitativer und quantitativer Vergleich der Aminosäure-
zusammensetzung von Sabal-Fractionen und pharmakologisch
wirksamen Fractionen aus anderer Herkunft

Aminosäure	Anteil in Mol % bezogen auf den Proteinanteil					
	Achillea- Prot.-Glyc. (60)	Soja- Prot.-Glyc. (52)	K 1 d	K 1	Proteinfraktionen	
					a	b
Cys	6.62	-	0	0	7.91	4.99
Hyp	5.91	2.95	-	-	-	-
Asp	13.02	10.37	8.30	5.98	3.75	4.47
Thr	4.93	9.01	7.20	2.80	1.40	1.26
Ser	6.86	6.29	8.26	6.00	2.63	2.72
Glu	12.54	15.94	12.78	31.80	36.63	36.47
Pro	4.68	2.95	5.04	3.01	2.88	2.92
Gly	16.86	8.89	9.97	11.81	9.96	10.64
Ala	6.46	13.45	12.80	5.94	2.59	2.98
Val	5.00	5.02	5.50	2.28	0.48	0.53
Met	0.43	0.50	1.09	0.21	3.11	1.83
Ile	2.09	1.87	3.48	0.58	0.15	0.37
Leu	3.54	3.87	6.41	2.97	1.35	1.42
Tyr	1.01	1.68	4.40	1.64	2.19	1.83
Phe	1.34	1.21	3.04	0	Spur	0
Orn	0.23	-	-	-	-	-
Lys	2.41	11.00	5.56	9.29	8.85	8.86
His	0.71	1.43	1.26	1.71	2.17	2.07
Arg	1.92	3.58	4.88	13.99	13.94	16.72
ca. Protein- anteil der Fraktion in % *)						
	25	20	7	10	60 - 100	

- nicht bestimmt

*) berechnet aus dem Aminosäuregehalt

Molekulargewichtsbestimmung durch Gelpermeationschromatographie

Nach dem Verhalten von Fraktion BMÜ-K bei der Gelchromatographie über Sepharose CL - 6B, vermuteten wir, daß das Molekulargewicht dieser Fraktion im Fraktionierungsbereich dieses Gels, d.h. etwa zwischen 10^5 und 10^6 liegen müßte. Wir versuchten nun diesen Bereich durch Gelpermeationschromatographie etwas weiter einzuengen. Gleichzeitig erwarteten wir von dieser Methode in Verbindung mit einem Differentialrefraktometer eine höhere Auflösung und somit einen weiteren Hinweis auf die Einheitlichkeit der Fraktion.

Als Trennsystem verwendeten wir ein Gel mit dem Fraktionierungsbereich von $MG\ 2 \times 10^3 - 2 \times 10^6$ (μ -Bondagel E-Linear und μ -Bondagel E-100*), Elutionsmittel: 0.1 N - Kaliumdihydrogenphosphat (pH 4.3). Wir eichten das System mit Dextranen der Molekulargewichte 40 000 und 110 000.

Der Peak unserer Fraktion verteilte sich über einen weiten Molekulargewichtsbereich mit einem Maximum bei 118 000.

Polymere, deren Molekulargewicht im allgemeinen nicht einheitlich ist, charakterisiert man durch eine Reihe von Kenngrößen, bzw. deren statistischer Mittelwerte (61).

Die Verteilung der Molmasse wird beschrieben durch das Zahlenmittel $\bar{M}_n$ und das Gewichtsmittel $\bar{M}_w$ (62). Zur Berechnung dieser Werte (63) werden die Höhen des Peaks der zu beschreibenden Fraktion in möglichst vielen Abschnitten gemessen und die Peakhöhen mit den korrelierenden Molekulargewichten nach den unten angegebenen Gleichungen verknüpft. Die Peakhöhen stehen stellvertretend für die Zahl der Moleküle (n_i). Die gemessenen, bzw. errechneten Werte werden, wie in Tabelle 22, S. 67, dargestellt, angeordnet und die Reihen 2, 4 und 5 aufaddiert. Aus den Summen dieser Reihen ergeben sich dann $\bar{M}_n$ und $\bar{M}_w$ nach folgenden Gleichungen:

$$\bar{M}_n = \text{Reihe 2} / \text{Reihe 4}$$

$$\bar{M}_w = \text{Reihe 5} / \text{Reihe 2}$$

Diese Gleichungen beruhen auf der theoretischen Gleichung:

$$\bar{M} = \frac{\sum_i n_i M_i^b}{\sum_i n_i M_i^{b-1}}$$

$$M = \bar{M}_n \text{ wenn } b = 1$$

$$M = \bar{M}_w \text{ wenn } b = 2$$

*) Firma Waters, Königstein

T a b e l l e 22

Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3	Reihe 4	Reihe 5
Retentionsvol.	Höhe (mm)	MG *)	R.2/R.3	R.2xR.3
Einheiten				
72.5	0.5	1150 000	4.348×10^{-7}	575 000
75	1.0	780 000	1.282×10^{-6}	780 000
78	1.0	490 000	2.041×10^{-6}	490 000
80	3.0	360 000	8.333×10^{-6}	1080 000
82	9.0	263 000	3.422×10^{-5}	2367 000
85	19.0	164 000	1.159×10^{-4}	3116 000
87	32.0	118 000	2.712×10^{-4}	3776 000
90	31.0	75 000	4.133×10^{-4}	2325 000
92	31.0	54 000	5.741×10^{-4}	1674 000
95	16.0	34 000	4.706×10^{-4}	544 000
97	16.0	24 500	6.531×10^{-4}	392 000
100	15.0	15 000	1.0×10^{-3}	225 000
102	11.0	11 200	9.821×10^{-4}	123 200
105	6.0	7 000	8.571×10^{-4}	42 000
107	3.0	5 200	5.769×10^{-4}	15 600
Σ 184.5			5.96×10^{-3}	17524 800

*) abgelesen aus der Eichgerade

$$\bar{M}_n = \frac{\sum \text{Reihe 2}}{\sum \text{Reihe 4}} = 30\,953$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum \text{Reihe 5}}{\sum \text{Reihe 2}} = 94\,985$$

Das Elutionsvolumen ist direkt proportional M_i , dem Molekulargewicht, die Amplitude der Kurve ist direkt proportional n_i , der Anzahl der Moleküle dieses Molekulargewichtes.

Ein Maß für die Einheitlichkeit der Molmasse (61) ist der Quotient $\bar{M}_w/\bar{M}_n$; je mehr sich dieser Wert von 1 unterscheidet, desto uneinheitlicher sind die Molmassen.

In unserem Fall war $\bar{M}_w/\bar{M}_n = \frac{95\,000}{31\,000} = 3.06$. Dieser Quotient bestätigt den schon optisch am Chromatogrammbild ablesbaren weiten Molekulargewichtsbereich, der BMÜ-K-Fraktion.

5.0 Zusammenfassung und Vergleich der analytischen Daten

In Tabelle 23, S. 69, sind alle ermittelten analytischen Daten der BMÜ-S- denen der BMÜ-K-Fraktionen gegenübergestellt. Hinzugefügt wurden noch die Werte für die optische Drehung ($c = 0.57$ für BMÜ-K, bzw. $c = 0.725$ für BMÜ-S).

Die Hauptunterschiede zwischen beiden Fraktionen liegen, außer in der Wirksamkeit, im Stickstoff, bzw. Eiweißgehalt, der quantitativen Neutralzucker- und Uronsäurezusammensetzung und der optischen Drehung. Die negative optische Drehung der BMÜ-K-Fraktionen weist auf eine β -glykosidische Verknüpfung hin.

In Tabelle 24, S. 70, sind außerdem die verfügbaren analytischen Daten anderer am Carrageeninpfotenödem getesteter Fraktionen aufgelistet.

Das Xylan und Galctomannan aus dem Holz von *Larix laricina* bzw. *Trifolium alexandrinicum*-Samen sind unter F. 2.3, S.95, näher beschrieben. Das aus der Färberdistel - *Carthamus tinctorius* - beschriebene Polysaccharid wurde nicht auf seine antiphlogistische Wirkung untersucht. Die Substanz zeigt eine Kreuzantigenität mit einem Pneumokokken-Polysaccharid (65).

Aus der Gegenüberstellung dieser analytischen Daten läßt sich kein annähernd übereinstimmendes gemeinsames Bauprinzip erkennen. Auf denkbare, gemeinsame Partialstrukturen wurde allerdings nicht eigens geprüft.

T a b e l l e 23

Analytik der hochmolekularen Fraktionen

	BMÜ-K	BMÜ-S
MG	>100 000	>100 000
C	41%	39%
N	Spur-2.27%	0%
H	5.5%	5.1%
O	47%	44%
Asche	4.6%	5.0%
Ca	0.8%	0.9%
Mg	0.4%	0.8%
K	0.28%	0.15%
Na	0.15%	0.19%
P	< 0.1%	0%
S		0%
Gesamt-Eiweiß n. LOWRY	3.6%	0%
Gesamt-Neutralzucker	60%	66%
Gesamt-Uronsäuren	14%	26%
α ²⁵⁰ _D	-25.2%	+15.4%
Ödemhemmung (1 mg/kg i.v.)	87%	62%

T a b e l l e 24

(65)

FRAKTION	ACHILLEA- PROTEO- GLYCAN (60)	CBC III (MÜNZING) (32)	S 3 AUS SOJA (MÜNZING) (32)	FRAKTION 1 A. SEPHAD - G 100 - SÄULE	BMÜ-K	POLYGONUM- CUSPIDATUM- POLYSACCH. (64)	XYLAN (ROTH)	GALACTO- MANNAN	CARTHAMUS- TINCTORIUS- POLYSACCH.
Odemhem. [%] bei (mg/kg)	35 40	61 1	30 0,09		65 90 0,1 1		0	10 3	
Gehalt in der Droge					0,2				0,15
$[\alpha]_{25}^{\circ}$ D					- 25,2°				- 27°
MG·10 ⁻³	30 - 70	3 - 4		100	100	6			
Asche		0,92	17,51	3,67	4,17				3,2
Eiweiß n. Lowry			18,3	16	3,6				
Neutral- zucker	Glu +++ Xyl +++ Ara +++ Rha +, Man + Gal +	Glu +++ Ara +, Man + Rha +	Gal Ara Xyl Rha	Gal +++ Ara ++ Xyl +, Man + Glu +, Rha +	Gal +++ Ara ++ Xyl +, Man + Glu +, Rha +	Glu +++ Gal ++ Man ++ Rha +, Ara +	Man +++ Xyl +++ Glu ++	Man +++ Gal +++	Xyl +++ Fru ++ Gal ++ Glu +, Ara + Rha +
gesamt			54		60	100	100	100	85
Ürönsäur. gesamt					14				10
Aminosäu. gesamt			19,4						
Aminozuc. gesamt			<1						
C		50,0	40,3	40,8	42,0		39,2		
H		6,3	5,58	5,32	5,75		5,2		
N	4,07	3,17	2,15	2,46	0,6		0		
O					45				
P	0,28		0,19	0,05					
S	1,56								
K			++	+	+				
Na			-	+	+				
Ca			+	++	++				
Mg			+	++	++				

E. Pharmakologie, allgemein

1.0 Die Pathophysiologie der Entzündung

Entzündung bezeichnet man eine komplexe lokale Reaktion des Gefäß- und Bindegewebsapparates auf einen schädigenden Reiz. Die Faktoren, die eine Entzündung auslösen, können sehr unterschiedlicher Natur sein. Man kennt biologische (Mikroorganismen), chemische (Gifte) oder physikalische Faktoren (mechanische, Temperatur- oder Strahleneinwirkung). Die Ursache der primär chronischen Polyarthritis, eine Autoimmunreaktion, ist endogen bedingt (66,67). Der Entzündungsverlauf wird in drei nacheinander ablaufende Phasen unterteilt (69):

In der ersten Phase, der sogenannten exsudativen Phase, werden nach Schädigung oder Reizung von Zellen bestimmte, als Mediatoren bezeichnete Substanzen in erhöhten Mengen ausgeschüttet. Hierzu gehören Histamin aus Gewebemastzellen, Plasmakinine aus dem Kininsystem des Blutes, lysosomale Hydrolasen und basische Proteine aus weißen Blutzellen, Komponenten des Komplementsystems und ihre Spaltprodukte und Prostaglandine (68). Diese Mediatoren erhöhen die Permeabilität der Kapillaren und Venolen und bewirken so den Austritt eiweißreicher Flüssigkeit (Exsudat) in das umgebende Gewebe und somit die Ausbildung eines lokalen Ödemes. Die Mediatoren liegen am Ort ihrer Freisetzung in besonders hoher Konzentration vor und zeigen dort ihre höchste Wirksamkeit. Sie können prinzipiell auch mit dem Blut zu anderen Organen transportiert werden und dort vorhandene Rezeptoren stimulieren. Charakteristisch für diese Mediatoren ist ihr außerordentlich schneller Abbau unmittelbar nach der Freisetzung (68).

In der zweiten Phase stehen die Emigration von Leukozyten und der Gewebeerfall im Vordergrund. Die durch Zerstörung der Lysosomenmembran der Leukozyten freigesetzten lysosomalen Enzyme (Hydrolasen, Proteasen, Esterasen) depolymerisieren die Makromoleküle des Bindegewebes (z.B. Kollagen, Mucopolysaccharide). Dieser Vorgang begünstigt durch Erhöhung des osmotischen Druckes die vermehrte Wasseraufnahme und somit die Ödembildung. Die ebenfalls aus den Lysosomen freigesetzte Phospholipase A_2 spaltet aus Membranphospholipiden Arachidonsäure ab, die die Ausgangssubstanz der Prostaglandinbiosynthese ist. Durch Anstieg der energieliefernden Prozesse, Glykolyse und Atmung, erhöht sich der Gehalt an ATP. Dadurch wird neben den schon freigesetzten Mediatoren Histamin und den Kininen über die Aktivierung der Phospholipase A_2 die Prostaglandinbiosynthese stimuliert (68,70).

Die dritte, proliferative Phase der Entzündung ist durch reparative Vorgänge, wie Makrophagenanreicherung und Neubildung von Bindegewebe im entzündlichen Gebiet gekennzeichnet.

Die exsudative Phase ist charakteristisch für die akute Verlaufsform, die proliferative Phase, besonders, wenn sie mit Gewebewucherungen einhergeht, für die chronische Verlaufsform der Entzündung.

Hat das die Entzündung auslösende Agens Antigencharakter, reagiert es mit dem dazugehörigen Antikörper zum Immunkomplex. Durch den Immunkomplex wird das Komplementsystem aktiviert und die sogenannte "Komplementkaskade" ausgelöst. Dabei werden Substanzen freigesetzt, die zu verstärkter Phagozytierbarkeit des Immunkomplexes (Opsonine), zu vermehrter Kapillarpermeabilität (kinin-ähnliches C_2 -Fragment)(71), zur chemotaktischen Fixierung von Granulozyten (Leukotaxine) und schließlich zur Lyse des Antigens führen. Andere Antikörper führen durch Anlagerung an die Rezeptoren von Mastzellen ohne Beteiligung des Komplementsystems zur Freisetzung von Histamin, das dann wiederum zu einer Kapillarerweiterung und Permeabilitätssteigerung führt (72). Serotonin spielt als Entzündungsmediator

bei Ratten und Mäusen etwa die gleiche Rolle wie Histamin beim Menschen oder Affen. Zu den Mediatoren im weiteren Sinne könnte man noch ein im Jahre 1976 von NIJKAMP et al. (73) entdecktes Peptid zählen, das im Lungenperfusat von Meer-schweinchen im anaphylaktischen Zustand vorkommt. Diese Sub-stanz (genannt RCS-RF, rabbit aorta contracting substance-releasing factor) setzt Arachidonsäure frei, aus der dann RCS, als ein Gemisch von PG-Endoperoxiden und Thromboxan A_2 synthetisiert wird.

NIJKAMP et al. vermuten, daß diese Substanz mit der ebenfalls zu den Mediatoren gehörenden SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) identisch ist. Aus den PG-Endoperoxiden kön-nen dann die Mediatoren PGE_1 und PGE_2 synthetisiert werden.

Eine kurze Übersicht über die bis heute bekannten Wirkungs-mechanismen gibt die Tabelle 25, S. 74, wieder.

Bildung von Entzündungsmediatoren und deren Wirkung

Mediatoren und Regelfaktoren	Vorstufe bzw. Bildungsort	Freisetzung durch	direkt	Wirkung auf den Entzündungsprozeß	indirekt
Histamin	bildet zusammen mit basischen Proteinen Ionenbindung mit Heparin	Mastzellenrezeptor-Stimulation	durch H ₁ -Rezeptor-Stimulation 1. Endothelkontraktion und 2. Bronchokonstriktion	erhöhte Ulzerogenität im Magen durch H ₂ -Rezeptorstimulation	
Bradykinin Kallidin	Kininogen im Plasma	Kallikrein	Erhöhung der Gefäßpermeabilität Schmerzauslösung	Aktivierung der Phospholipase A ₂ und somit der Prostaglandinbiosynthese	
Prostaglandine E ₁ , E ₂ (74)	Arachidonsäure in Membranphospholipiden	1. Phospholipase A ₂ 2. PG-Synthetase-System	Erhöhung der Gefäßpermeabilität Herabsetzung der Schmerzschwelle	Hemmung der Histaminfreisetzung und damit Regulierung der Magensaftaktivität	
Kininartiges C2-Fragment	Komplementsystem	Antigen-Antikörper-komplex	Erhöhung der Gefäßpermeabilität	Stimulierung der Mastzellendegranulation und somit Histaminausschüttung durch nicht gebundene Antikörper	Induktion der Mastzelldegranulation
Lysosomale Enzyme	Lysosomen der Leukozyten	Entzündungsfaktoren (Irritantien)	Depolymerisierung von Bindegewebssubstanz		Freisetzung von Histamin
Serotonin (68) bei Ratten und Mäusen	Gewebemastzellen	Mastzellenrezeptorstimulation	in bestimmten Gefäßgebieten, wie Skelettmuskulatur, dilatierend, widerstandsmindernd		biosynthetische Vorstufen der Prostaglandine E und F
RCS-RF (73) Rabbit aorta contracting substance-releasing factor	Lungengewebe	Anaphylaxie	Freisetzung von RCS, (das offensichtlich mit SRS-A, slow reacting substance of anaphylaxis identisch ist), einem Gemisch aus den Prostaglandinendoperoxiden PGG ₂ und PGH ₂ und Thromboxan A ₂ , verursacht Bronchokonstriktion		

2.0 Substanzen, die den Verlauf der Entzündung beeinflussen

Von den gebräuchlichen Antiphlogistika haben die Steroide das breiteste Wirkungsspektrum. Sie wirken antiproliferativ, stark antiallergisch und immunsuppressiv (67). Sie unterdrücken fast alle biologischen Vorgänge der akuten und der chronischen Entzündung wie Kapillarerweiterung, Permeabilitätssteigerung und damit den Austritt von Serum, Plasma und Leukozyten in das entzündete Gewebe, ferner die Antikörperbildung, die Phagozytose und die Fibroblastenproliferation (66). Man nimmt an, daß sich die Steroide in die Lipidmembranen (z.B. der Lysosomen) einlagern und über die Stabilisierung dieser Membranen die Freisetzung zytotoxischer Enzyme verhindern (66,67). Durch Steigerung der fibrinolytischen Aktivität wird das Plasmafibrinogen und somit die Narbenbildung vermindert (66). Die Freisetzung von Prostaglandinen wird nicht, wie bei den nicht steroiden Antiphlogistika, über eine Hemmung des Prostaglandinsynthetasesystems (68), sondern über eine verminderte Freisetzung von Arachidonsäure durch Phospholipase A₂ über eine RCS-RF-Blockade erreicht (73).

Dieser Vielzahl von positiven biologischen Wirkungen steht eine große Zahl von Nebenwirkungen gegenüber. Besonders zu nennen sind die Schwächung der Infektionsabwehr, und die Verzögerung der Wundheilung durch Hemmung der Gewebeneubildung, ferner die diabetogene Wirkung durch Stimulierung der Gluconeogenese und alle Symptome einer Nebennierenrindenüberfunktion (Cushing-Syndrom) (66,67,76).

Den synthetischen, nicht steroiden Antiphlogistika (= NSA; z.B. Salizylate, Pyrazolon-, Pyrazolidin-, Anthranilsäure- und Phenyllessigsäurederivate, Indometacin und Analoga) werden folgende entzündungshemmende Mechanismen zugeordnet: Hemmung des Prostaglandinsynthetasesystems (77,78,79), Hemmung der Histidindecaboxylase und somit der Histaminbildung (66), Stabilisierung der Lysosomen (66,67), Hemmung proteolytischer Enzyme und Hemmung der Mucopolysaccha-

rid-Biosynthese (66,67). Die antiproliferative Wirkung wird neuerdings durch eine Verdrängung der Corticosteroide durch NSA aus der Plasmaeweißbindung erklärt (78). Der Wirkmechanismus ist jedoch keine kompetitive Verdrängung, sondern eine qualitative oder quantitative Veränderung des Trägerproteins.

Die lange Jahre postulierte Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung (66) und somit Hemmung der Mucopolysaccharidsynthese konnte durch in-vivo-Experimente nicht bestätigt werden (78).

Zu den wichtigsten Nebenwirkungen der NSA zählen ihre Ulzerogenität und die Hemmung der Thrombozytenaggregation, ferner bei hochdosierter Dauertherapie Lebertoxizität und Nekrotisierung der Nierenpapillen (79). Von Vorteil ist neben der analgetischen, die antipyretische Wirkung der NSA. Diese läßt sich ebenfalls durch eine Prostaglandinsynthesehemmung erklären, denn Prostaglandine zählen zu den stärksten fiebererzeugenden Substanzen (80).

3.0 Antiphlogistisch wirksame Pflanzen

Die chemischen Strukturen von aus Pflanzen isolierten, antiphlogistisch wirksamen Substanzen sind noch vielfältiger, als die der Synthetika. Bei der Kompliziertheit des Entzündungsgeschehens mit so vielen Eingriffsmöglichkeiten ist dies allerdings nicht verwunderlich. BENOIT et al. (81) untersuchten 163 Pflanzen- und Pilzarten auf ihre antiphlogistische Aktivität. Sie testeten mit Petroläther entfettete Äthanolextrakte auf ihre Hemmwirkung auf das Carrageenin-Rattenpfotenödem. Von 163 untersuchten Drogen hemmten 17 die Ödembildung um 30 - 39%, 21 um 40 - 49%, 15 um 50 - 59%, 4 um 60 - 69% und 2 sogar um mehr als 70%. Das bedeutet, von 163 untersuchten Drogen waren in diesem Test 59, das sind mehr als ein Drittel, wirksam. Bei der angewandten Extraktionsmethode wurden allerdings nur vorwiegend äthanollösliche Substanzen erfaßt. Wasserlösliche oder mit Äthanol

fällbare, sowie mit Petroläther wieder ausschüttelbare Substanzen wurden somit nicht berücksichtigt, obwohl es auch hierfür zahlreiche Beispiele gibt.

Nachfolgende wird eine Übersicht über die bisher als Antiphlogistika verwendeten Drogen gegeben.

Schleimdrogen:

Diese werden nicht nur in der Volksmedizin-äußerlich als Kaptaplasmen bei Furunkeln, Ulcera und Drüenschwellungen und innerlich als Schutzstoffe für entzündete Schleimhäute verwendet.

Zu nennen sind folgende Drogen: *Althaea officinalis* (82), *Malva neglecta* und *M.silvestris*, *Tussilago farfara* (83), *Plantago lanceolata* und *P.psyllium*, *Cydonia oblonga*, *Trigonella foenum-graecum* und *Linum usitatissimum* (84).

Saponindrogen:

Unter den vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften der Saponine haben in jüngerer Zeit auch die antiexsudativen Aktivitäten großes Interesse gefunden. Besonders gut untersucht wurde das Aescin aus *Aesculus hippocastanum* (43,69,85, 86,87,88,89). Vergleichbare Wirkungen zeigten Saponine aus *Eryngium planum* und *Sanicula europaea* (90) und *Camellia sinensis* (91).

Mit Quillaiiasaponin läßt sich nach intraperitonealer Applikation eine durch dasselbe Saponin lokal induzierte Entzündung hemmen (92).

Glycyrrhizin aus *Glycyrrhiza glabra* beeinflusst weniger die exsudative, als die späteren Phasen der Entzündung (84). Der Wirkungsmechanismus scheint in einer Hemmung des Cortisonabbaus in der Leber zu bestehen. Allerdings hemmt es die antigranulomatöse Wirkung des Cortisons (93).

Flavonoide und Chromanderivate:

GABOR (94) erwähnt als besonders gut antiphlogistisch wirksam Taxifolin, Rutin und die partialsynthetischen O-(β -Hydroxyäthyl)-rutoside, phosphoryliertes Hesperidin, sowie Centchroman. Brasilin und Haematoxylin sind das antiinflammatorische Prinzip in *Caesalpinia sappan* und *Haematoxylon campechianum* (95).

Hautreizmittel:

Ein altes Verfahren zur Behandlung von Entzündungen ist die Behandlung mit Hautreizmitteln wie Senföl, Crotonöl, Terpenin, Kampfer und Kanthariden. Durch eine oberflächliche Hyperämie werden tiefergelegene Entzündungen beeinflusst (96, 97, 98, 99).

Bestandteile des Kamillenöls:

Kamillenzubereitungen gelten aufgrund umfangreicher klinischer Beobachtungen seit langem als wirksame entzündungshemmende Mittel. Nach heutiger Auffassung ist ihr therapeutischer Wert im wesentlichen auf das Chamazulen, bzw. dessen genuine Vorstufe Matricin, ferner das (-)- α -Bisabolol und das cis-2-Hexadiin-(2,4)-yliden-1,6-dioxaspiro-(4,4)-nonen-(3) (En-In-Dicycloäther) zurückzuführen (100, 101, 102).

Alkaloiddrogen:

Im weiteren Sinne könnte man auch Colchicin (68, 103, 104) als entzündungshemmend bezeichnen. Es blockiert Chemotaxis und Phagozytose, die durch Harnsäuremikrokristalle beim Gichtanfall ausgelöst werden. Berberin wirkt schwach antiexsudativ (95).

Pflanzenenzyme - Enzyminhibitoren:

Ficin aus verschiedenen *Ficus*-Arten, Papain aus *Carica papaya* (105), Bromelin (106) aus *Ananas comosus* und Streptodornase und Streptokinase aus Streptokokken (107) sind Proteasen, die extern und intern zur Heilung eitriger Wunden, zur Auf-

lösung von Blutgerinnseln und zur Regenerierung nekrotischen Gewebes verwendet werden. Proteinaseinhibitoren aus Fabaceen, Solanaceen, Poaceen, Chenopodiaceen, Mikroorganismen und das besonders zu erwähnende Aprotinin aus Rinderorganen hemmen destruktive Enzymsysteme wie z.B. das Kallikrein-Kinin-System (108,109).

Drogen, mit noch weitgehend unbekannten Wirkprinzipien

Während bei *Aristolochia clematitis* (110,111) die Aristolochiasäure als Wirkprinzip erkannt wurde, ist dasjenige von *Echinacea pallida* und *Echinacea angustifolia* (84,112) noch unbekannt. Die Aristolochiasäure aktiviert die körpereigenen Makrophagen, die Entzündungserreger phagozytieren.

Andere als antiinflammatorisch beschriebene Drogen sind *Arnica montana* (113), *Piper methysticum* (114), *Simaba cedron* (115) und *Oroxylon indicum* (116).

Als eine weitere Gruppe kann man antiinflammatorische Wirkprinzipien zusammenfassen, die aus Wasserextrakten von verschiedenen Pflanzen und Mikroorganismen durch Fällung mit Alkohol oder Aceton gewonnen wurden. Der chemische Aufbau und die Molekulargewichte dieser Fraktionen sind größtenteils unbekannt. MÜNZING (32) fand bei der Testung von entsprechend dargestellten Fraktionen aus 16 verschiedenen Pflanzen eine deutliche antiexsudative Wirksamkeit. Fraktionen aus den Früchten von *Glycine soja*, *Cocos nucifera* und verschiedenen Poaceen hemmten die Rattenpfotenödembildung um 30% schon bei Dosierungen von weniger als 0.2 mg/kg i.v.. Ein ähnliches, wenn auch weit weniger angereichertes Prinzip isolierten GOLDBERG et al. (60) aus *Achillea millefolium*. Eine den MÜNZING-Fractionen vergleichbare Wirkung fand MICHAHELLES (117) bei *Allium cepa*.

MURAKAMI et al. (64) isolierten aus *Polygonum cuspidatum* ein niedermolekulares neutrales Polysaccharid, SAEKI et al. (118) aus den Stoffwechselprodukten der Enterobacteriacee *Serratia piscatorum* ein hochmolekulares saures Polysaccharid, beide mit carrageenin-ödem-hemmender Wirkung.

F. Pharmakologie speziell

1.0 Abgrenzung des wirksamen Prinzips aus Sabal serrulata gegenüber Proteinaseinhibitoren

Im vorangegangenen Kapitel wurde ausgeführt, daß einer der möglichen Wirkungsmechanismen von isolierten ödemhemmenden Prinzipien auch über eine Proteinasehemmung zustande kommen kann. Solche proteolytischen Enzyme können z.B. die pharmakologisch hochaktiven Polypeptide Bradykinin und Kallidin in Freiheit setzen. Da diese Substanzen für die Entstehung des Carrageeninödems mitverantwortlich sind, lag es nahe, die in diesem Entzündungsmodell hochwirksamen Sabal-Fractionen auch auf eine mögliche proteinaseninhibierende Wirkung zu untersuchen.

Die natürlichen Inhibitoren proteolytischer Enzyme, die im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet vorkommen, sind Proteine mit 0 - ca. 25% Kohlenhydratanteil und Molekulargewichten im Bereich zwischen 5000 und 25000 (108, 109). Unsere Fraktionen hatten 0 - ca. 4% Proteinanteil und ein Molekulargewicht von über 100 000. Ein solcher Aufbau entsprach nach bisheriger Kenntnis nicht dem eines natürlichen Inhibitors.

Zur allgemeinen Prüfung auf Proteinaseninhibition benutzten wir Trypsin als proteolytisches Enzym und N-Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE) als Substrat (119,120). Der Grad der Enzymhemmung wurde durch die photometrische Bestimmung von N-Benzoyl-L-arginin im Versuchsansatz ermittelt und die Enzymaktivität des Trypsins ohne Inhibitorzusatz mit der Enzymaktivität nach Zusatz steigender Konzentrationen an Sabal-Fractionen verglichen. Wir konnten in diesem Testmodell keine Hemmung der Enzymaktivität feststellen, stattdessen fanden wir eine leichte Steigerung der Enzymaktivität um 3,5%. (Meßwerte siehe Exp. Teil, Kapitel 4.0, S.115).

2.0 Beschreibung und Ergebnisse der durchgeführten pharmakologischen Teste

Um herauszufinden, in welcher Phase des Entzündungsverlaufes unsere Sabalfraktionen wirksam sind, unterzogen wir sie nach dem Carrageeninpfotenödemtest noch weiteren Testmodellen und verglichen die Ergebnisse mit Literaturergebnissen anderer antiphlogistisch wirksamer Substanzen.

Die einzelnen Phasen des Entzündungsverlaufs kann man mit verschiedenen Entzündungsmodellen simulieren. Mit dem UV-Erythemtest und dem Ödemtest prüft man Substanzen auf ihre Wirkung gegen exsudative Prozesse. Die verschiedenen Granulomteste erfassen proliferative Prozesse. Mit dem sogenannten Adjuvans-Arthritis-Test ermittelt man Wirkungen auf die akute und chronische Phase des Entzündungsverlaufs (66).

Beim UV-Erythem wird die minimale Substanzmenge ermittelt, die die Erythembildung in der rasierten Haut des Meerschweinchens nach UV-Bestrahlung um 2 Stdn. gegenüber unbehandelten Kontrolltieren verzögert.

Beim Pfotenödem wird die Ödembildung nach subplantarer Applikation eines Irritans (Phlogistikum) mit der Ödembildung an Tieren, die zuvor ein (meist systemisch) appliziertes Antiphlogistikum erhalten haben, verglichen (66). Als Phlogistika verwendet man z.B. Ovalbumin, Dextran, Carrageenin, Histamin, Serotonin, Bradykinin und den Histaminliberator Compound 48/80*) für die initiale Phase der Entzündung und Formalin, Kaolin, Bienengift oder Bäckerhefe für die initiale, die mittlere und spätere Phase der Entzündung. Da die beiden letzten Substanzen das Gewebe nicht zu eliminieren vermag, kommt es zu Gewebeerfall und Nekrotisierung (43).

Die primäre Exsudationsphase kann man außerdem durch subkutane Implantation eines saugfähigen Reizkörpers (z.B. Kunststoffpellet) simulieren. Die sich bildende Exsudatmenge bei den mit dem Antiphlogistikum behandelten Tieren vergleicht man mit der Exsudatmenge unbehandelter Tiere (43).

Beim Granulomtaschen-Test wird am Rattenrücken durch Injektion von Luft eine subkutane Höhle angelegt, in die man Carrageenin oder Crotonöl als Phlogistikum injiziert. Nach lokaler oder systemischer Behandlung mit dem zu prüfenden Antiphlogistikum wird die Menge des sich bildenden Granulationsgewebes mit der unbehandelter Tiere verglichen. Eine Variante dieses Testes ist der Cotton-Pellet-Test. Anstelle von Lufttaschen und Irritantien implantiert man hierbei Wattepresslinge. Die Granulomteste eignen sich infolge ihrer proliferativen Wirkung besonders zur Beurteilung von steroiden Antiphlogistika.

*) Kondensationsprodukt aus N-Methyl-p-methoxy-phenyläthylamin und Formaldehyd.

Adjuvans-Arthritis induziert man durch Injektion von Freund'schem Adjuvans*) in die Rattenpfote. Nach der Ausbildung eines lokalen Ödems, das man zur Messung der akuten antiphlogistischen Wirkung heranziehen kann, kommt es nach etwa 10 Tagen zu einer erneuten Schwellung der Pfote und zu sekundären Entzündungserscheinungen an den anderen Extremitäten, speziell an den Gelenken. Dieses Modell erlaubt die Bestimmung der Aktivität eines Antiphlogistikums gegen die chronischen Verlaufsformen der Entzündung. Die Symptome ähneln denen der menschlichen Arthritis. Hier wirken besonders Steroide, aber auch nichtsteroidale Antiphlogistika und Immunsuppressiva (66).

2.1 Prüfung auf antiexsudative Wirkung

Das am meisten verwendete Entzündungsmodell ist das Carrageenin-Rattenpfoten-Ödem. Es wurde 1962 von WINTER et al. (121) erstmals verwendet und war die Voraussetzung für die Entdeckung der antiphlogistischen Wirkung des Indometacins (122). Die Verwendung dieses Testes bewährt sich vor allem wegen seiner Empfindlichkeit gegenüber relativ geringen Dosen sowohl steroider als auch nichtsteroider Antiphlogistika. Außerdem zeigt er eine gute Korrelation mit den später in der klinischen Anwendung gefundenen Wirksamkeiten (123). Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt in einer gegenüber anderen Modellen besseren Reproduzierbarkeit, da die Abstammung der verwendeten Tiere offensichtlich keinen Einfluß auf die Reaktionsrate der verschiedenen Stämme hat (124). Eine weitere Optimierung bei der Anwendung an Ratten erreicht man durch die Verwendung nur männlicher Tiere, da diese stärkere und gleichmäßigere Pfotenödeme ausbilden (125).

DI ROSA et al. (126) fanden heraus, daß man den Verlauf des Carrageeninpftenödems in 3 Abschnitte unterteilen kann, in denen jeweils bestimmte Mediatoren für die Aufrechterhaltung der Gefäßpermeabilität verantwortlich sind:

- | | |
|---------------------------------|--------------------|
| 1. Histamin- und Serotoninphase | von 0 - 1.5 Std. |
| 2. Kininphase | von 1.5 - 2.5 Std. |
| 3. Prostaglandinphase | ab 2.5 Std. |

*) Eine Suspension von abgetöteten Mycobakterien und Tensiden in Mineralöl.

Das maximale Ödemvolumen ist nach 7 Stdn. erreicht. Nach 15 Tg. bildet es sich ohne Behandlung wieder vollständig zurück (94,127).

Beobachtungen von WILLIS (128) untermauern diese Unterteilung. Nach neueren Untersuchungen von DOHERTY und ROBINSON (129) ist die Ödembildung in den ersten 40 Min. nach der Provokation allerdings allein durch das Injektionstrauma bedingt und damit unabhängig vom verwendeten Irritans.

CAPASSO et al. (123) fanden nach gleichzeitiger Applikation von Kininasehemmern und Carrageenin eine Verstärkung der Ödembildung, die sie durch Applikation von Chymotrypsin wieder aufheben konnten.

Ob die Freisetzung der Prostaglandine durch Carrageenin direkt induziert wird, oder nur als Folge der Histamin-, Serotonin- und Kininfreisetzung eintritt, ist unseres Wissens nicht geklärt. Jedoch scheint ein Wirkungssynergismus zu bestehen. FORD-HUTCHINSON et al. (74) beobachteten nach gleichzeitiger Applikation von Carrageenin und den Prostaglandinen E_1 und E_2 eine starke Zunahme der Ödembildung, jedoch bei ausschließlicher Anwendung der Prostaglandine fast keine Reaktion. Eine Kombination von Carrageenin mit den Prostaglandinendoperoxiden erbrachte keine Wirkungsverstärkung. NOORDHOEK et al. (130) und HIRSCHELMANN et al. (131) beschrieben eine Senkung der Komplementaktivität nach systemischer Applikation von Carrageenin. Da Komplement verbraucht wird, kann man annehmen, daß eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet. Wird das Carrageenin lokal, also z.B. subplantar appliziert, bildet die am entstehenden Entzündungsherd ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktion einen Teilmechanismus des Entzündungsgeschehens. Durch Phagozytose der Antigen-Antikörperkomplexe werden lysosomale Enzyme freigesetzt, die nun ihrerseits den Entzündungsverlauf fördern. Unterstützung findet diese Annahme durch die Beobachtung von ANDERSON et al. (132), daß nach einer Ödemprovokation in einer Rattenpfote eine weitere Schwellung unterdrückt wird, wenn man die nächste Carrageenininjektion ca. 7 bis 14 Tg. nach der ersten appliziert. Injiziert man jedoch als zweites Irritans Dextran, so schwillt die Pfote wie bei unbehandelten Tieren. Umgekehrt beeinflusst eine vorausgehende Dextraninjektion weder eine darauffolgende Carrageenin- noch Dextranödemprovokation. Daraus schließen wir, daß die Unterdrückung des Carrageeninödems durch ein Antiphlogistikum einen Eingriff in einen oder mehrere dieser Wirkmechanismen darstellt.

In Frage kamen:

1. eine Hemmung der Kininfreisetzung (Proteinaseninhibition)
2. eine Kininogendepletierung bei systemischer Applikation
3. eine Phagozytosehemmung
4. eine Komplementdepletierung
5. eine Prostaglandinsynthetasehemmung.

Die Abbildungen 21 - 26, S.85,86,88, geben einen Überblick über die Beeinflussung des Verlaufs des Carrageenin-Rattenpfortenödems nach Behandlung mit verschiedenen Sabalfraktionen.

Die Applikation der Testsubstanz erfolgt bei den Fraktionen K 2 (Abb. 21) und K 1 d (Abb. 22) jeweils 1 Stde., bei allen übrigen Fraktionen 1 1/1 Stdn. vor der Ödemprovokation. Vom Irritans wurden jeweils 0.1 ml einer 0.6%igen Lösung in bidestilliertem Wasser subplantar injiziert. Von den Testsubstanzen wurden die auf den Abbildungen angegebenen Dosen gelöst in Na-Phosphatpuffer (pH 7.2 - 7.4) intravenös verabreicht. Um injiziertes Volumen und Tiergewicht in Korrelation zu bringen, erfolgte die Dosierung jeweils in mg/5 ml/kg.

Der Verlauf der Kontrollkurve für die Ödembildung wurde aus den Mittelwerten von 50 Einzelmeßreihen errechnet. Aufgetragen ist die Zunahme des Pfortenvolumens in Prozent gegen die Zeit in Stunden. Die Pfortenvolumina wurden jeweils 3, 5 und 24 Stdn. nach Ödemprovokation gemessen, bei Fraktion K 2 außerdem auch schon 2 Stdn. danach. Da der Meßpunkt nach 2 Stdn. auf einer durch den Nullpunkt und durch die Meßpunkte bei 3 und 5 Stdn. gezogenen Kurve liegt, haben wir die Kurven in den übrigen Diagrammen entsprechend verlängert. Vergleicht man den Dosis-Wirkungs-Verlauf von Fraktion K 2 (Abb. 21) mit Fraktion K 1 d (Abb. 22), den beiden wirksamsten Fraktionen aus den Kernen nach dem Isolierungsweg I, fällt auf, daß bei Fraktion K 2 praktisch keine Abhängigkeit zwischen Dosis und Wirkung besteht. Alle Dosierungen liegen

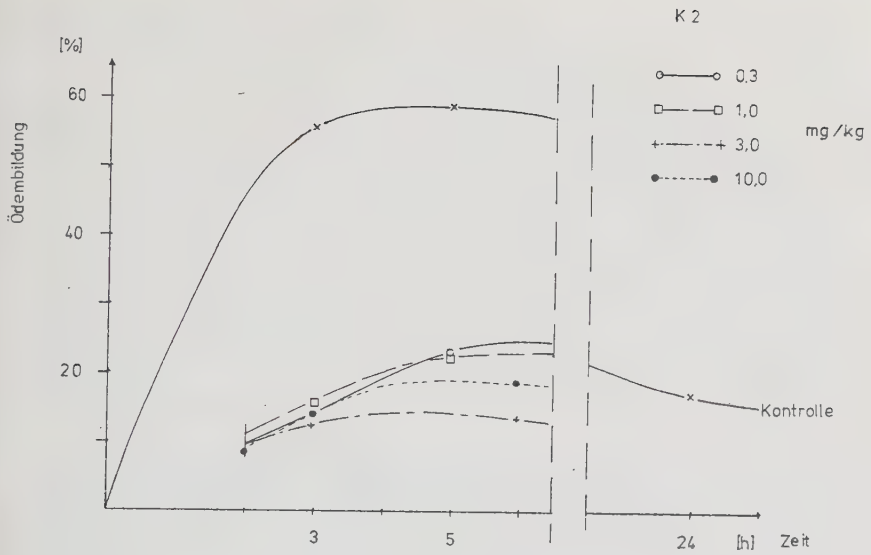


Abb. 21

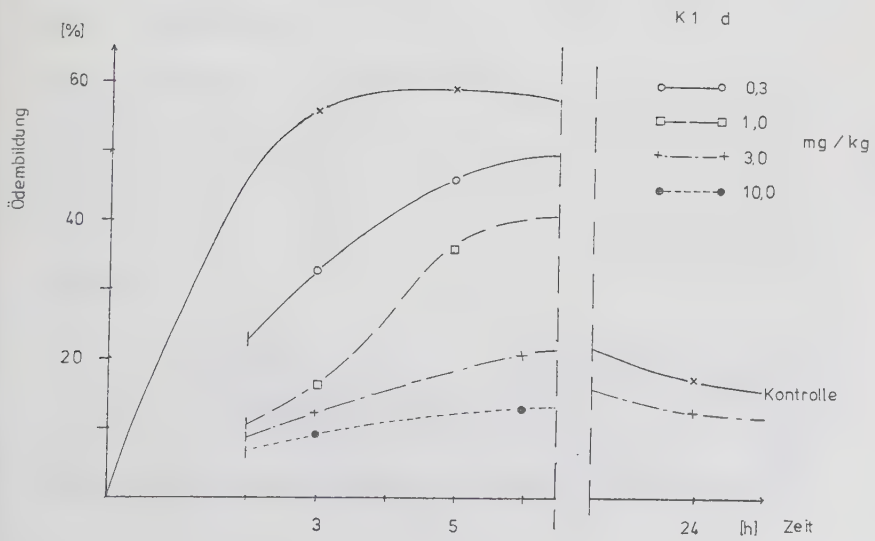


Abb. 22

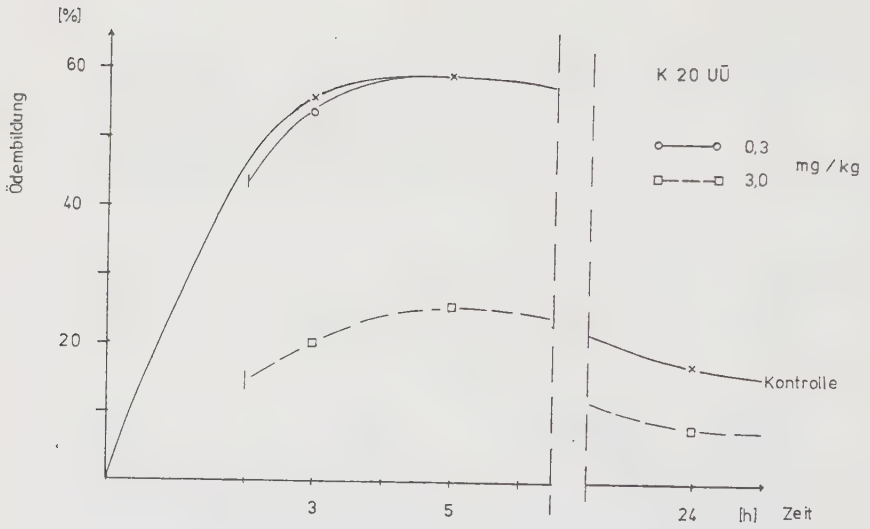


Abb. 23

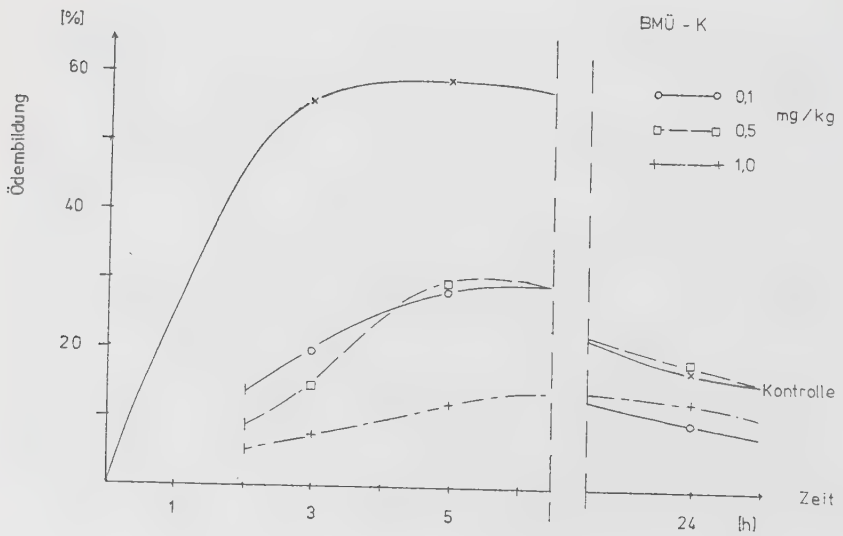


Abb. 24

also schon im supramaximalen Bereich. Erst eine weitere Herabsetzung der Dosierung, wie z.B. bei der vergleichbaren Fraktion BMÜ-K (Abb. 24), läßt diese Abhängigkeit wieder erkennen. Beim Vergleich der Fraktionen K 20 UÜ (Abb. 23) mit BMÜ-K (Abb. 24) und S 20 UÜ (Abb. 25) mit BMÜ-S (Abb. 26) wird die erreichte Anreicherung des Wirkprinzips von den Endprodukten des Isolierungsweges IIa zu den Endprodukten des Isolierungsweges IV deutlich. Außerdem erkennt man die deutlich geringere Wirkung der Schalenfraktion (BMÜ-S) gegenüber der Kernfraktion (BMÜ-K). Die Meßwerte für die Meßpunkte nach 3 und 5 Stdn. waren jeweils hochsignifikant ($p < 0.001$). Die Werte für die Punkte nach 24 Stdn. können zufallsbedingt sein.

In Abb. 27, S. 89, sind Ergebnisse von DI ROSA et al. (126) in das gleiche Diagrammschema transferiert. Zur Untersuchung der biochemischen Mechanismen der Carrageeninödembildung blockierten diese Autoren nacheinander verschiedene Mediatorphasen. Die Blockade der Histamin-Serotonin-Phase wurde durch vorangehende Depletierung der Mastzellgranula mit Compound 48/80 erreicht, die der Kininphase durch vorangehende Depletierung von Kininogen mit Cellulosesulfat (CS) und sowohl die der Kinin-, als auch der Prostaglandinphase durch totale Enzymhemmung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP).

Bei differenzierter Betrachtung des Diagramms kann man erkennen, daß der Ödembildungsverlauf in der jeweils blockierten Mediatorphase gehemmt ist. In derselben Arbeit untersuchten die Autoren auch den Ödemverlauf nach Depletierung des Komplements mit Antileukozytenserum. Sie fanden hierbei eine mindestens 6 Stdn. anhaltende ca. 50%ige Hemmung der Ödembildung.

Die Fraktion BMÜ-K aus Sabal läßt sich keiner dieser Mediatorphasen allein zuordnen. Allerdings bleibt der genaue Verlauf in der Histaminphase unberücksichtigt, da wir zwischen 0 und 2 Stdn. keine Ödembestimmungen durchführten. Voraussetzung für eine Wirkung in dieser Phase wäre allerdings

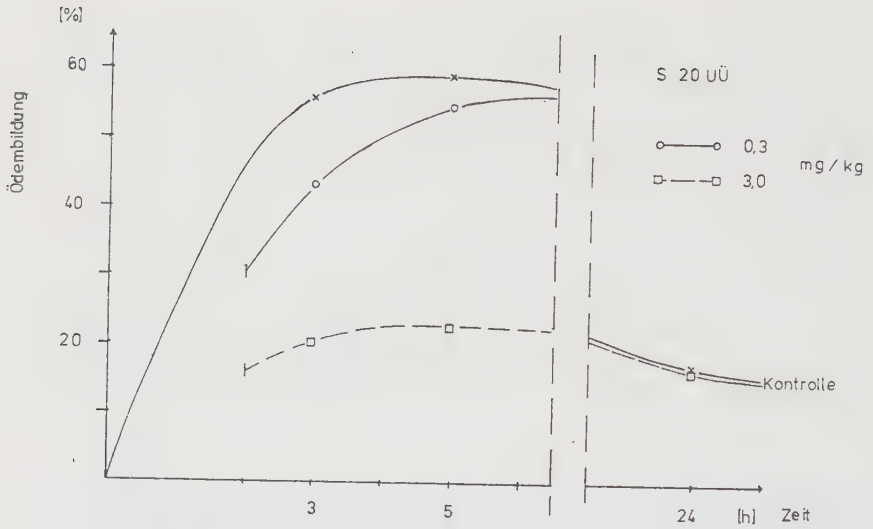


Abb. 25

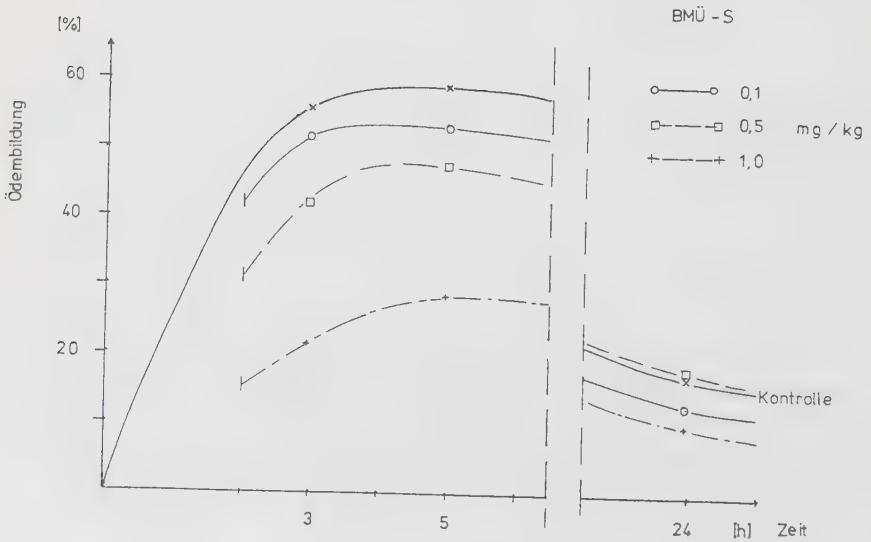


Abb. 26

(zumindest bei der Ratte) eine gleichzeitige Antihistamin- und Antiserotoninwirkung. Hierüber liegen bei Polysacchariden keine Angaben vor.

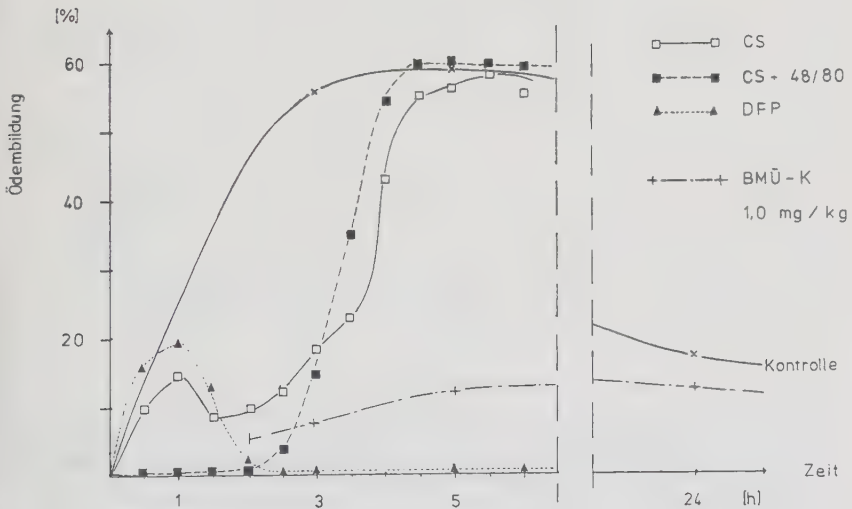


Abb. 27

Nach dem weiteren Verlauf der Hemmkurve der Substanz BMÜ-K können wir jedoch nicht ausschließen:

1. eine Hemmung der Kininphase (ähnlich CS) und/oder
2. eine Hemmung der Prostaglandinphase.

Hinzu kommt eine 3. Möglichkeit, die nicht aus dem Diagramm ersichtlich ist: eine antikomplementäre Wirkung.

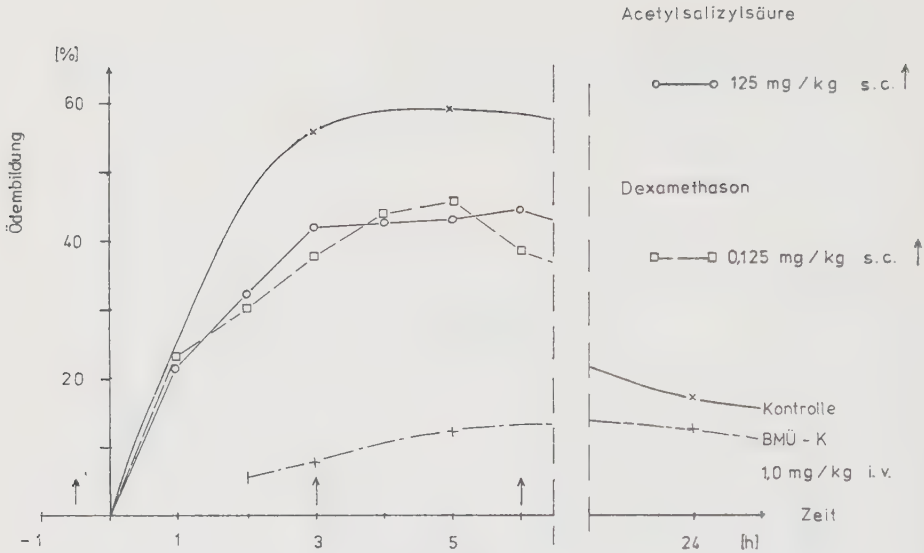


Abb. 28

Zur besseren Einschätzung der Wirksamkeit des antiphlogistischen Wirkprinzips in Sabalkernen am Carrageenin-Rattenpforten-Ödem haben wir in das gleiche Diagrammschema einige bekannte Antiphlogistikatypen transferiert. Selbst wenn man die unterschiedlichen Applikationsarten (die Dosierungen verhalten sich: i.v.: i.p. = 1 : 2 - 3 und i.v.: s.c. = 1 : 5 (69) berücksichtigt, entspricht die Wirksamkeit der Sabalfraction in diesem Testmodell in etwa der von Dexamethason (Abb. 28).

Die Dosierungen von Phenylbutazon (Abb. 29, S. 91) liegen schon im subletalen bzw. letalen Bereich. Das Wirkprinzip des Glycyrrhizins (Abb. 30, S. 91) ist mit diesem Testmodell nur schlecht zu beschreiben.

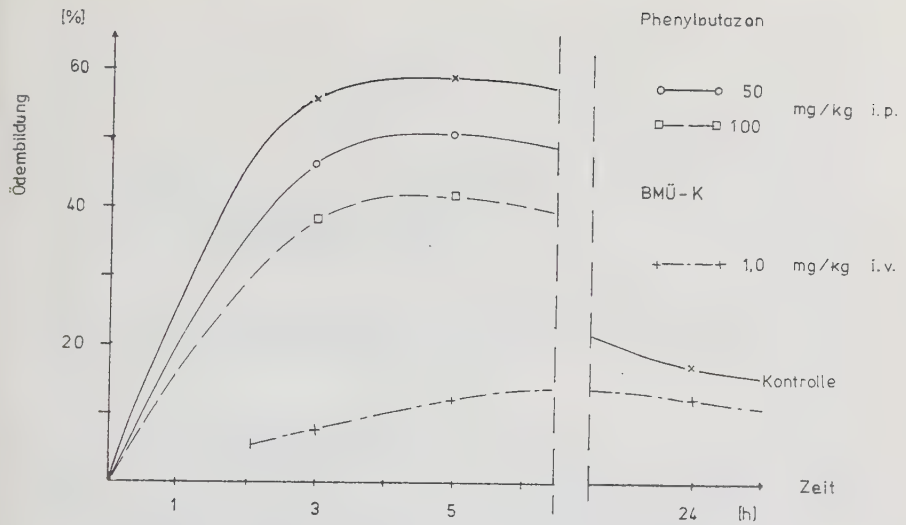


Abb. 29

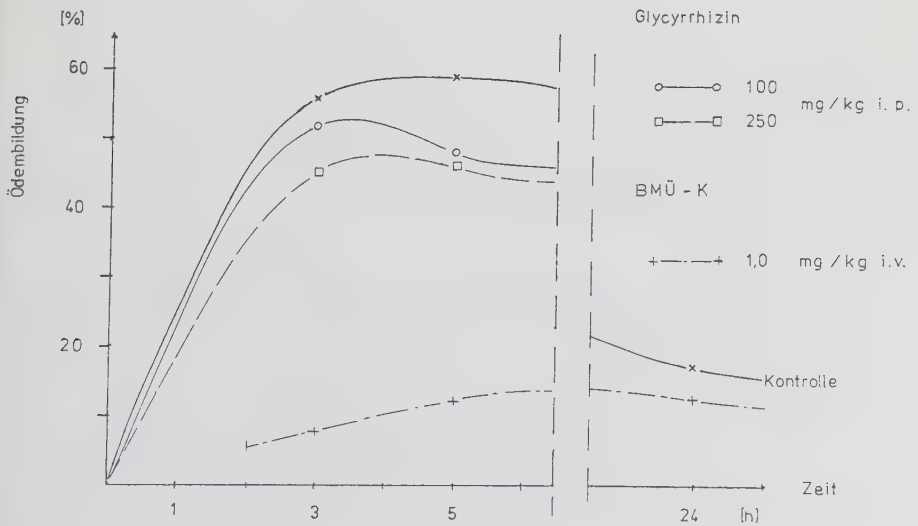


Abb. 30

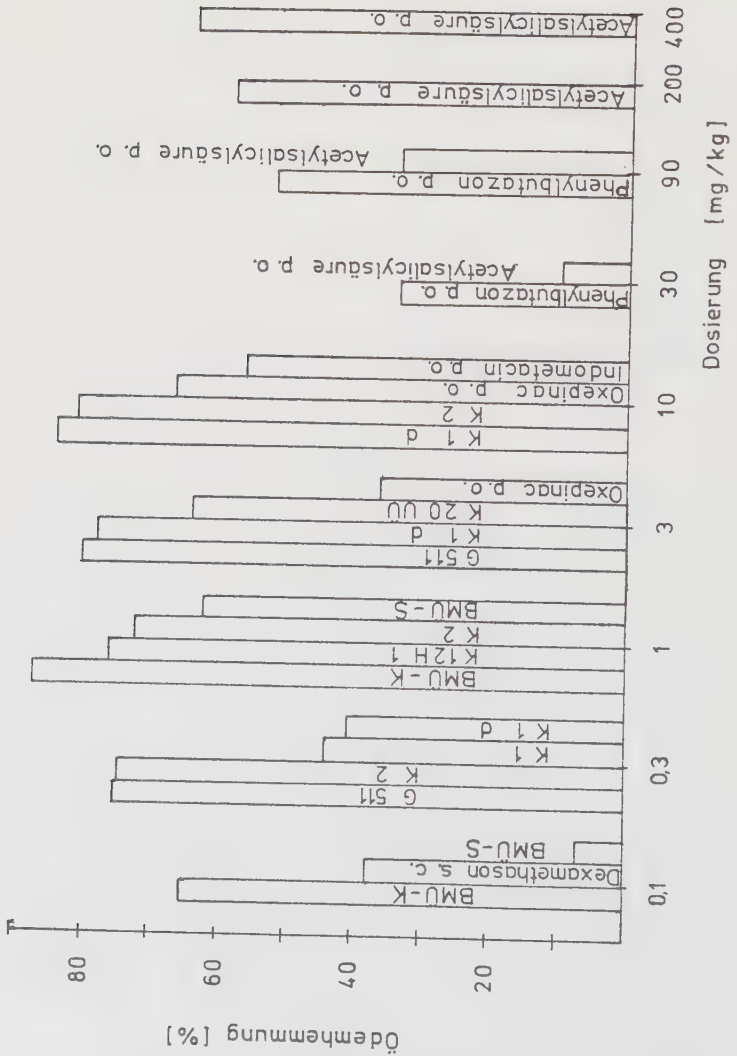


Abb. 31

Abb. 31, S. 92, gibt eine Gegenüberstellung von Sabal-Fractionen und synthetischen Antiphlogistika wieder. Die Hemmung des Carrageenin-Rattenpfoten-Ödems ist gegen die Dosierung aufgetragen. Die Dosierung i.v.: p.o. verhält sich in etwa wie 1 : 10 (69). Der Wert für Dexamethason wurde den Arbeiten von BONTA et al. (133), die Werte für Oxepinac, Indometacin, Phenylbutazon und Acetylsalizylsäure den Arbeiten von TSUKUDA et al. (134) entnommen.

Zwei weitere Teste, die die exsudative Phase der Entzündung simulieren, sind das Stauungsödem (135) und der Kunststoffpellet-Test (43).

Das Stauungsödem ist eine länger anhaltende und schwerere Form der Ödembildung, als das Carrageeninödem. Auch hier werden jedoch Pfotenödeme erzeugt und gemessen. Die Ödembildung wird provoziert, indem man die rechte hintere Pfote 5mal 20 Min. mit einem Wollfaden umschnürt. Die Applikation der Testsubstanzen erfolgt 1 1/2 Stdn. vor und 24, sowie 48 Stdn. nach Ödemprovokation i.v. in die Schwanzvene. Die Ödeme wurden 3, 5, 24 und 48 Stdn. nach der Provokation gemessen und mit denen der Tiere verglichen, die nur das Lösungsmittel injiziert bekommen hatten.

Substanz BMÜ-K hemmte dieses Ödem um 20 - 35% bei einer Dosierung von 3 x 0.1 mg/kg i.v. und um 6 - 20% bei einer einmaligen Applikation von 0.5 mg/kg i.v.. Diese Wirkung ist nur als mittelmäßig zu bezeichnen.

Beim Kunststoffpellet-Test wird der Ort der Entzündung unter die Rückenhaut der Ratte verlegt. Ein Polyurethankügelchen wird unter die Rückenhaut der Ratten implantiert. Die Testsubstanz wird 1 1/2 Stdn. vor der Implantation einmal i.v. in die Schwanzvene appliziert. 2 Stdn. nach der Implantation werden die Pellets entnommen und ihre mittleren Gewichte mit denen aus einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Die nach der Implantation des saugfähigen Reizkörpers auftretenden Vorgänge - die Bildung eines Exsudates - entsprechen ebenfalls dem initialen Stadium der Entzündung.

In diesem Testmodell erwies sich Fraktion BMÜ-K wiederum als gut wirksam. Die Hemmung der Exsudatbildung betrug bei einer Dosierung von 0.5 mg/kg 55% und bei einer Dosierung von 1.0 mg/kg 58% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe.

2.2 Prüfung auf antiproliferative Wirkung

Zur weiteren Eingrenzung des Wirkungsmechanismus des antiphlogistischen Prinzips aus Sabalkernen, prüften wir dessen Wirkung im Granulomtaschentest.

Dieses Testmodell simuliert vor allem die späteren Stadien der Entzündung, wobei es im Prinzip gleichgültig ist, ob die Granulomprovokation z.B. durch Croton-Öl oder Suspensionen abgetöteter Mycobakterien induziert wird (43).

Verwendet man Crotonöl als Irritans, wie in unserem Test, so kommt es zunächst zur Exsudat- und anschließend zur Granulombildung.

Zur Durchführung des Tests wurden den Ratten 1.0 ml einer 1.5%igen Lösung von Crotonöl im Olivenöl s.c. in einen 25 ml großen Luftbeutel injiziert.

Die Testsubstanzen BMÜ-K und zum Vergleich Hydrocortison bekamen die Tiere 10mal i.v. in 11 Tagen in die Schwanzvene. Am 11. Versuchstag wurden die Ratten getötet. Die Beutelbeschaffenheit wurde beurteilt, ihr Feucht- und Trockengewicht ermittelt und mit dem der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. In diesem Test konnte - zumindest bei der angewandten Dosierung von $10 \times 0.5 \text{ mg/kg i.v.}$ - weder Exsudat- noch Granulationshemmung festgestellt werden, während Hydrocortison mit 31 bzw. 27% Hemmung wirksam war.

Das antiphlogistische Wirkprinzip aus Sabalkernen hat also keinen Einfluß auf die späteren, reparativen bzw. proliferativen Stadien der Entzündung.

Bisher hatten wir bei allen Tests unsere Fraktion immer nur parenteral appliziert. Nun galt es noch zu klären, ob dieses Wirkprinzip auch nach peroraler Applikation wirksam war. Aus diesem Grunde prüften wir die Fraktion BMÜ-K wiederholt am Kunststoffpellet-Test nach peroraler Applikation. Der Test wurde durchgeführt, wie oben beschrieben, BMÜ-K jedoch 3mal (21, 4 und 1 Stde. vor Implantation) in der 10fachen Dosierung ($3 \times 10^{-2} \text{ mg/kg p.o.}$) verabreicht. Es war kein antiexsu-

dativer Effekt erkennbar. Daraus muß geschlossen werden, daß das antiexsudative Wirkprinzip enteral nicht resorbiert wird. Offensichtlich besitzt die Substanz ein zu großes Molekulargewicht um noch resorbiert zu werden.

PITTMAN et al. (136) haben Resorption, Ausscheidung und Abbau von Carrageeninen in Tieren untersucht. Sie fanden, daß je nach Tierart Verbindungen mit Molekulargewichten zwischen 10 000 und 85 000 noch resorbiert werden können. Das Molekulargewicht unserer untersuchten Fraktion dürfte nach unserer Schätzung >100 000 sein. Vermutlich ist dies der Grund für die perorale Unwirksamkeit.

2.3 Pharmakologische Untersuchung anderer Polysaccharide

Im Kapitel E. 2.0, S. 79, wurden einige in letzter Zeit isolierte Polysaccharide erwähnt, denen eine carrageenin-ödemhemmende Wirkung zugeschrieben wird. Die Angaben in der Literatur (32,60,64,65), die die chemische Zusammensetzung und die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung betreffen, sind jedoch so unvollständig, daß keine Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden können.

Um das Strukturspektrum noch etwas zu erweitern und in Erfahrung zu bringen, ob die antiphlogistische Wirkung von Polysacchariden an bestimmte Strukturtypen gebunden ist, testeten wir willkürlich zwei weitere Polysaccharide, die uns zur Verfügung standen. Substanz 1 war ein Galactomannan*) aus *Trifolium alexandrinicum*-Samen, Substanz 2 ein Xylan**) aus dem Holz von *Larix laricina* mit folgender Zuckerzusammensetzung: Xylose 37.5%, Mannose 44.8% und Glucose 24.8% (52). Wir testeten beide Substanzen in Dosierungen von jeweils 0.3 und 3.0 mg/kg i.v. am Carrageenin-Rattenpfoten-Ödem. Die maximale Hemmung betrug für beide Substanzen bei der höheren Dosierung um 10%. Diese geringen Hemmwirkungen waren statistisch nicht signifikant. Sie können zufällig

*) diese Substanz wurde uns von Herrn Dr.V.M.Chari, Mitarbeiter unseres Institutes, zur Verfügung gestellt.

**)Xylan "Roth", Art.-Nr. 2-8953

bedingt sein (137). Daraus kann man den Schluß ziehen, daß bei Polysacchariden offenbar gewisse Strukturmerkmale (Molekulargewicht, Zuckerzusammensetzung, Bindungsverhältnisse usw.) gegeben sein müssen, um eine antiphlogistische Wirkung auszulösen. Allerdings ist, wie die Carrageenin-Wirkung zeigt, nicht auszuschließen, daß Strukturwirkungs-Beziehungen in der Reihe der Polysaccharide nur innerhalb bestimmter Entzündungsphasen existieren.

3.0 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen über das antiphlogistische Wirkprinzip aus Sabalkernen, geben keine eindeutige Auskunft über den Wirkungsmechanismus. Schließen wir eine Proteinasenhemmwirkung aus, so bleiben eine Anzahl weiterer Angriffspunkte:

1. Kininogendepletierung über Aktivierung des Hageman-faktors
2. Phagozytosehemmung
3. Komplementdepletierung
4. Prostaglandinsynthetasehemmung
5. Hemmung basischer Proteine (Enzyme)
6. Indirekte Wirkung über Stimulierung der ACTH- oder Glucocorticoidfreisetzung, wie z.B. bei Aescin (138)
7. Beeinflussung des Katecholaminspiegels (139)

Zu 1: Eine neuartige Plasmakallikreinbestimmung (140) ist auf die Beobachtung von KLUFT (141) aufgebaut, daß Dextransulfat (MMG 500 000) aus Plasmapräkallikrein über die Aktivierung des Hageman-Faktors (Faktor XII des Fibrinolyse-Systems) Kallikrein aktiviert. Dieses aktivierte Kallikrein setzt aus Kininogen Kinine frei. Eine vergleichbare Wirkung zeigt beispielsweise Carrageenin (124) bei i.p. Applikation. Man nimmt an, daß die systemische Applikation dieser Substanzen, ebenso wie die von Cellulosesulfat (126) zu einer Aktivierung des Kininogen-Kininsystems und so zu einer Reduzierung der zirkulierenden Kininmenge führt. Die verminderte Wirksamkeit des Phlogistikums bei subplanter Injektion kann dann auf einem Mangel an Kininen beruhen.

- Zu 2: HIRSCHELMANN et al. (131) brachten die antiphlogistische Wirksamkeit des Carrageenins mit einer Verminderung der Makrophagentätigkeit in Zusammenhang. Die Phagozytose und die damit verbundene Freisetzung lysosomaler Hydrolasen mit vermehrter Bildung von Prostaglandinen und Lysophosphatiden mit der daran gekoppelten Immunkörperbildung könnten gebremst werden.
- Zu 3: GIROUD und TIMSIT (142) beobachteten nach i.v.-Injektion sulfatierter, negativ geladener Polysaccharide (Pentosanpolysulfat, Cellulosesulfat und Dextransulfat) eine deutliche Senkung des Komplementtiters und brachten die negative Ladung der Polysaccharide damit in Zusammenhang. Eine ödemhemmende Wirkung ließ sich durch Komplexierung dieser Substanzen mit dem basischen Protein Protamin vermindern.
- Zu 4: Nach FORD-HUTCHINSON et al. (74) moduliert Carrageenin die Ödembildung durch die Prostaglandine E_1 und E_2 oder umgekehrt. Eine Interaktion dieser synergistischen Wirkung könnte ödemhemmend wirken.
- Zu 5: ESCHENBRUCH (143) beschreibt eine Hemmung basischer Enzyme durch anionische Substanzen, wie z.B. Hyaluronsäure oder saure Polysaccharide. Ebenso könnten permeabilitätssteigernde basische lysosomale Proteine blockiert werden.
- Zu 6: PREZIOSI et al. (138) fanden heraus, daß z.B. Aescin über die Stimulierung der Nebennierenrinde seine antiphlogistische Wirkung ausübt. Eine Untersuchung an adrenaletomierten bzw. hypophysectomierten Ratten könnte diesen Punkt klären.
- Zu 7: ARNTZEN und BRISEID (139) stellten fest, daß das Carrageenin-Ödem durch Katecholamine oder durch aminospeicher-entleerende Substanzen gehemmt wird. Diese Wirkung ließ sich durch Monoaminoxidasehemmer verstärken. Sie schlossen daraus, daß die Katecholamine ein Bindeglied im Entzündungsablauf darstellen. Eine Beeinflussung des Katecholaminspiegels könnte also ebenso zu einer Beeinflussung des Carrageenin-Ödems führen. Für eine Interaktion von Polysacchariden haben wir jedoch keinen Anhaltspunkt.

Das aus Sabalkernen gewonnene antiphlogistisch wirkende Polysaccharid enthält ca. 13% Uronsäure. Man könnte es also der Gruppe saurer Polysaccharide zuordnen, die den Komplementtiter senken oder basische Proteine blockieren. Allerdings müßte dann das Polysaccharid aus Sabalschalen die größere Wirksamkeit zeigen, denn dessen Uronsäureanteil

ist etwa doppelt so hoch. Eine Aktivierung des Hagemanfaktors auf Grund einer bestimmten Oberflächenstruktur wäre ebenfalls diskutierbar. Ausschließen können wir jedoch eine spezifische Anticarrageenin-Wirkung durch eine Kreuzantigenität mit Carrageenin, da in diesem Fall keine so gute Hemmung des Kunststoffpellet-Tests zu verzeichnen gewesen wäre.

Unsere hochwirksamen Kernfraktionen enthielten immer noch einen Restgehalt an Stickstoff, den wir einem "freien oder gebundenen" Proteinanteil zuordneten. Diese Fraktionen zeigten eine wesentlich ausgeprägtere Wirksamkeit, als die Schalenfraktionen. Ob sich diese bessere Wirksamkeit jedoch von diesem Proteinanteil ableitet, oder ob die Wirkung nur von der Polysaccharidstruktur abhängt, konnten wir nicht sicher klären. Wir schließen jedoch aus den variierenden Stickstoffwerten einzelner getesteter vergleichbarer Fraktionen, die gleiche pharmakologische Wirksamkeit zeigten, daß dieser Proteinrest keine entscheidende Rolle für die antiphlogistische Wirkung spielt.

Zur Frage der Wirksamkeit von Sabalpräparaten des Handels

Sabalpräparate die zur Zeit im Handel sind, enthalten entweder äthanolische oder wässrige Auszüge der Sabalfrüchte, meist in Kombination mit weiteren Drogenextrakten oder synthetischen Arzneistoffen. Hauptanwendungsgebiet dieser Präparationen sind Erkrankungen des Urogenital-Systems, wie Miktionsbeschwerden, Prostatitis, Prostataadenom und Reizblase.

β -Sitosterin als Wirkprinzip der äthanolischen Extrakte halten wir für sehr unwahrscheinlich. Die tägliche Dosierung dieser Substanz z.B. in Urgenin^R Tropfen beträgt in etwa 0.1 mg. Nach SCHWARTZKOPF und JANTKE (144) werden täglich schon 250 - 300 mg Phytosterine (überwiegend als β -Sitosterin) mit der Nahrung aufgenommen. Da dies ein Vielfaches der zusätzlichen therapeutischen Dosierung ist, schließen wir β -Sitosterin als Wirkprinzip aus. In den wässrigen

Extrakten (z.B. Urogenin^R Dragees oder Suppositorien) dürfte ohnehin kaum freies β -Sitosterin vorliegen.

Nicht ausschließen können wir eine antiphlogistische Wirkung der niedermolekularen Polysaccharidfraktion aus Sabalfrüchten (s.Kapitel D. 2.2, S. 29), da eine solche Fraktion ($MG < 10000$) enteral resorbiert werden kann. Als alleiniges Wirkprinzip ist sie jedoch unwahrscheinlich, da sie in den äthanolischen Auszügen aufgrund ihrer Fällbarkeit mit Äthanol nicht vorhanden sein dürfte.

Einen Zusammenhang zwischen diesen Fraktionen und der Wirksamkeit von Sabalpräparaten, besonders bei Prostatitis oder Prostataadenom, müßten Testmodelle vermitteln, die diese Krankheit quantifizierbar simulieren können. Derartige Modelle stehen derzeit nicht zur Verfügung.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Aus dem Wasserextrakt der Früchte von *Sabal serrulata* wurde ein hochwirksames antiödematöses Wirkprinzip angereichert. Es übertraf in seiner Aktivität in einem Vorscreening alle auf gleiche Weise gewonnenen Fraktionen aus verschiedenen anderen Pflanzen.

Ausgangsmaterial für die Darstellung dieses Wirkprinzips waren Methanolfällungen des Wasserextraktes. Die Fällungen wurden von niedermolekularen Verunreinigungen durch Ultrafiltration bei einer Trenngrenze von MG 10 000 gereinigt und die Retentate anschließend durch Gelchromatographie über Dextran-, Agarose- und Polyacrylamidgele in 3 Unterfraktionen aufgetrennt.

2. Die Testung dieser Unterfraktionen am Carrageenin-Rattenpfotenödem ergab für die Sabalkern-Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht die höchste Wirksamkeit. Von allen Methoden zur weiteren Reinigung erwies sich die Ultrafiltration mit einer Trenngrenze bei MG 50 000 als am besten geeignet.
3. Die chemischen Untersuchungen dieser Fraktion (Bez.: BMÜ-K) weisen auf ein polydisperses saures Polysaccharid mit einem verunreinigendem oder kovalent gebundenen Proteinanteil hin. Die Hauptkomponenten der Zuckereinheiten bilden Galactose (38.4%), Arabinose (18.7%) und Uronsäuren (14%). Das mittlere Molekulargewicht bestimmten wir mit etwa 100 000.
4. BMÜ-K zeigte eine 65%ige Hemmung der Ödembildung bei einer Dosierung von 0.1 mg/kg i.v. am Carrageenin-Rattenpfotenödem und eine 35%ige Hemmung am Stauungsödem bei einer Dosierung von 3 x 0.1 mg/kg i.v.. Die

Exsudatbildung im Kunststoff-Pellet-Test wurde zu 55% bei einer Dosierung von 0.5 mg/kg i.v. gehemmt. Beim Granulombbeuteltest wurden weder die Exsudat- noch Granulombildung beeinflusst.

Die Substanz wirkt somit ähnlich wie das eingehend untersuchte Aescin nur in der exsudativen, nicht aber in der proliferativen Phase der Entzündung.

Vergleichbare Hemmwirkungen am Carrageenin-Rattenpfoten-ödem zeigen synthetische Antiphlogistika, wie Acetylsalicylsäure, Phenylbutazon oder Indometacin erst bei einem Vielfachen der für BMÜ-K angegebenen Dosierungen.

Da das Wirkprinzip im Proteinasehemmtest keine Wirkung zeigt, kann eine Wirkung über die Hemmung proteolytischer Enzyme ausgeschlossen werden.

5. Eine Prüfung auf Wirksamkeit im Kunststoff-Pellet-Test nach peroraler Applikation ergab keine Hemmung der Exsudatbildung, da das Molekulargewicht für eine enterale Resorption offenbar zu hoch ist. Nachdem (Misch-) Fraktionen mit weitaus niedrigeren Molekulargewichten eine signifikante ödemhemmende Wirkung zeigten, schließen wir auf sich wiederholende Strukturelemente, die für diese Wirkung verantwortlich sind.

Der niedermolekulare Polysaccharidstrukturanteil ist möglicherweise eines der Wirkprinzipien von Sabalpräparaten.

EXPERIMENTELLER TEIL

1.0 Herkunft der Droge

Die luftgetrockneten ganzen Sabalfrüchte stellte uns die Fa.Madaus, Köln-Merheim zur Verfügung.

2.0 Isolierungsmethoden

2.1 Drogenextraktion

Als Lösungsmittel wurden verwendet:

Dichlormethan reinst (Merck Art.-Nr. 6049)

Äthylacetat reinst (Merck Art.-Nr. 864)

Wasser demineralisiert, Leitfähigkeit 2 μ S

20 kg luftgetrocknete Sabalfrüchte wurden zerschlagen und durch Absieben und Handverlesen in 8.8 kg Kerne und 11.2 kg Schalen und Fruchtfleisch getrennt. Jeder Anteil wurde für sich grob gepulvert und anschließend nacheinander mit jeweils 20 l Dichlormethan und Äthylacetat perkoliert (siehe Schema 2, S. 22). Die Drogenrückstände wurden an der Luft getrocknet und mit Wasser (Kerne 10 l, Schalen 15 l) erneut perkoliert.

Insgesamt wurden so aus den Kernen 1.7 kg (= 19.3%) und aus den Schalen 4.8 kg (= 42.9%) Extraktivstoffe gewonnen. Die Wasserextrakte wurden am Rotationsverdampfer bei 40°C auf 4 l (Schalen) bzw. 2 l (Kerne) eingeengt.

2.2 Methanolfällung

Fällungsmittel: Methanol reinst (Merck Art.-Nr. 6008)

Die Wasserextrakte tropften wir unter Rühren bei 4°C in 4 Vol.-Teile Methanol in 10 l-Maulaffen. Es bildete sich eine weiße flockige Fällung, die wir 3 Tg. bei 4°C absetzen ließen.

Die Hauptmenge des klaren ockerfarbenen Überstandes heberten wir vorsichtig ab, die Fällung und den Rest des Überstandes zentrifugierten wir 20 Min. bei 8000 U/min und 4°C.

Die Niederschläge wurden 2mal mit 1200 ml Wasser bei 4°C am Magnetrührer digeriert und die Lösung vom verbleibenden Niederschlag abzentrifugiert (20 min; 8000 U/min; 4°C). Die Lösungen wurden in Portionen zu je 200 ml eingefroren und bis zur Diafiltration aufbewahrt.

In Abweichung zu diesem Isolierungsweg wurde bei Isolierungsweg I nur mit Petroläther (DAB 7) vorextrahiert, immer bei Raumtemperatur gearbeitet und mit 10 Vol.-Teilen Methanol gefällt (siehe Schema 1, S. 14).

2.3 Dialyse

1.2 g Methanolfällung nach Isolierungsweg I wurden in 200 ml Wasser gelöst, in einen Dialysierschlauch eingefüllt und 4 Tage von fließendem Wasser umspült. In dem Schlauch bildeten sich bräunliche, schleimige Niederschläge, von denen abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet und gewogen.

Ausbeute: 326 mg = 27%.

Dialysierschlauch: Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich,
Kal.18, Kontrollnr.: 0056/4

2.4 Diafiltration

Die wieder löslichen Anteile der Methanolfällungen S 20 (aus den Schalen) und K 20 (aus den Kernen) wurden in Portionen zu je 200 ml durch Membranen der Trenngrenze bei MG 10 000 diskontinuierlich diafiltriert. Das Retentatvolumen wurde nach Verringerung auf 30 ml jeweils wieder mit Wasser zu 200 ml nachgefüllt, bis mit dem letzten Konzentrationsvorgang das Diafiltratvolumen etwa 500 ml betrug. Retentat und Diafiltrat wurden gefriergetrocknet. Aus der Lösung S 20 erhielten wir insgesamt 83 g S 20 UÜ (Retentat) und 83 g S 20 UF (Diafiltrat), aus K 20 15 g (= 40%) K 20 UÜ und 22 g (= 60%) K 20 UF.

Bezogen auf die Drogenausgangsmenge (20 kg) beträgt der Anteil an S 20 UÜ 0.42%, von K 20 UÜ 0.08%.

Ultrafiltrationszelle: Amicon Typ 202 (200 ml)

Membran: Amicon UM 10, Ø 62 mm

Filtrationsdruck: 4 bar (aus Stickstoffflasche)

Die zweite Diafiltration erfolgte durch Membranen der Trenngrenze bei MG 50 000.

S 20 UÜ und K 20 UÜ wurde in Anteilen von jeweils ca. 500 mg in 50 ml Wasser gelöst und diskontinuierlich bis zum Retentatvolumen von 10 ml konzentriert, bis das Ultrafiltratvolumen 400 ml betrug. Retentate und Diafiltrate wurden gefriergetrocknet.

S 20 UÜ verteilte sich auf 22% BMÜ-S (Retentat) und 78% BMF-S (Diafiltrat), K 20 UÜ in 14% BMÜ-K und 86% BMF-K.

Bezogen auf die Drogenausgangsmenge (20 kg) beträgt der Anteil an BMÜ-S 0.09%, von BMÜ-K 0.01%.

Ultrafiltrationszelle: Amicon Typ 52 (50 ml)

Membran: Berghof BM 500, Ø 43 mm

Filtrationsdruck: 4 bar (aus Stickstoffflasche).

2.5 Gelchromatographie

Verwendete Gele:

Agarosegele: Biogel A - 0.5 m, 100 - 200 mesh

effektiver Trennbereich MG $10^4 - 5 \cdot 10^5$

BIO RAD Laboratories Art.Nr. 1510140

Sephacrose CL-6B

effektiver Trennbereich MG $10^4 - 4 \cdot 10^6$

Pharmacia Fine Chemicals

Dextrangele: Sephadex G 50 fine
effektiver Trennbereich MG 1500 - 30 000
Sephadex G 100
effektiver Trennbereich MG $4 \cdot 10^3$ - $1.5 \cdot 10^5$
Pharmacia Fine Chemicals

Polyacrylamidgel: Biogel P 60, 100 - 200 mesh
effektiver Trennbereich MG $3 \cdot 10^3$ - $6 \cdot 10^4$
BIO RAD Laboratories Art.-Nr. 1510640

Agarose-/Polyacrylamidgel: Ultrogel AcA 44
effektiver Trennbereich MG $1.2 \cdot 10^4$ - $1.3 \cdot 10^5$
LKB, Art.-Nr. 5210-120

Eluens: Wasser

Säulen:

a) präparativ

Ø 20 mm, Höhe 560 mm, Totalvolumen 176 ml

Ø 25 mm, Höhe 900 mm, Totalvolumen 440 ml

Auftragemengen: 50 - 800 mg Substanz/ 1.0 - 4.0 ml Wasser

b) analytisch

Ø 16 mm, Höhe 350 mm, Totalvolumen 70 ml,

Typ K 16/40 mit Kühlmantel, Pharmacia Fine Chemicals

Pumpe: LKB 10 200 Perpex Pumpe, Getriebeübersetzung 3:250,
Schlauchdurchmesser 1.35 mm, Förderstrom 13 ml/h

Detektor: Fracto-Scan, Buchler Instruments Division,
Nuclear Chicago, Meßwellenlänge 254 nm

Schreiber: BD 8, Kipp und Zonen, Papiervorschub 0.5 mm/min

Fraktionssammler: LKB 2112 Redirac, Fraktionierung nach
Zeit (20 min/Fraktion)

Arbeitstemperatur: 13°C (Leitungswasserkühlung)

Trenndauer pro Analyse: ca. 6 Std., anschließende Regeneration ca. 18 Std.

Auftragsmengen: 5 - 120 mg Substanz/0.5 - 1.0 ml Wasser

2.6 Abtrennung des Proteinanteils durch enzymatische Verdauung

500 mg K 20 UÜ wurden in 100 ml eines Puffers aus 0.1 M NH_4HCO_3 und 2 mM CaCl_2 (pH 8.4) gelöst, mit 5 mg Pronase (Boehringer, Mannheim, Art.-Nr. 165 921) versetzt und 16 Std. bei 37°C inkubiert. Nach 8 Std. Inkubationszeit wurden weitere 5 mg Pronase zugegeben. Sank der pH-Wert unter 7, wurde er mit 0.1 N-NaOH wieder auf 8 - 9 eingestellt.

Anschließend wurde die Lösung durch eine Ultrafiltrationsmembran der Trenngrenze MG 10 000 mit insgesamt 800 ml Wasser diafiltriert und dabei auf 30 ml konzentriert. Retentat und Diafiltrat wurden gefriergetrocknet. Ausbeute insgesamt: 418 mg (= 84%), davon 175 mg (= 42%) als hochmolekulares Retentat.

3.0 Analytik

3.1 Mikroanalysen, Spektralanalysen

C-, H-, N-, O-, S-Bestimmungen, UV-, IR-, ^1H -NMR- und MS-Spektren und Bestimmungen der optischen Drehung wurden von der Mikroanalytischen Abteilung unseres Institutes unter der Leitung von Herrn Dr. Seligmann mit folgenden Geräten durchgeführt:

CHN-Analysator 185, Hewlett-Packard

O-Bestimmungen: Universalverbrennungsofen Heraeus

S-Bestimmungen: Schöniger-Methode

UV-VIS-Spektralphotometer DK-2 A, Beckman

IR-Spektrophotometer IR-8, Beckman

Kernresonanzspektrometer A-60 A, Varian

Massenspektrometer MS 30, AEI

lichtelektrisches Polarimeter LEP A 2, Zeiss

Die Schmelzpunkte der bei 10^{-2} Torr über Phosphorpentoxid getrockneten Substanzen bestimmten wir mit dem Kofler-Heiztischmikroskop der Fa. Reichert. Die Werte wurden nicht korrigiert.

3.2 Veraschungen

5 - 50 mg Substanz wurden in einen bis zur Gewichtskonstanz geglühten Tiegel eingewogen und mit 10%iger Ammoniumnitratlösung durchfeuchtet, im Trockenschrank eingedampft (1 Stde. 105°C) und dann im Muffelofen langsam bis zur dunklen Rotglut erhitzt und bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Vor dem Wiegen ließen wir die Tiegel im Exsiccator erkalten.

3.3 Flammenphotometrie

5 - 20 mg Substanz wurden in 5.0 ml Wasser gelöst. In dieser Lösung wurden Ca^{++} , K^{+} und Na^{+} direkt im Eppendorf Flammenphotometer bestimmt.

3.4 Komplexometrische Titrationen

20 - 70 mg Substanz wurden in Wasser gelöst und in dieser Lösung zunächst Calcium mit Calconcarbonsäure und nach Zerstören des Indikatorfarbstoffes durch Kochen mit Wasserstoffperoxid in alkalischer Lösung Magnesium mit Eriochromschwarz T als Indikator bestimmt. Übereinstimmende Werte wurden für Calcium bei der Titration mit Murexid als Indikator gefunden.

Detaillierte Arbeitsvorschrift siehe Broschüre:

"Komplexometrische Bestimmungsmethoden mit Titriplex ^R"
der Fa.E.Merck, Darmstadt, S. 26, 27 und 72.

3.5 Phosphorbestimmungen

(nach: Methoden zur Analytik von Phospholipiden von Dr.J.HÖLZL, 1974 (46).

Reagentien:

Veraschungssäure: Perchlorsäure 70% (vor der Veraschung mit einigen Körnchen Ammoniummolybdat schütteln).

Phosphorreagenz: (frisch bereiten, nur ca. 6 Stdn. haltbar)
Perchlorsäure 5% 8 Teile
Ammoniummolybdat 2.5% 1 Teil (1 - 2 Monate haltbar)
Ascorbinsäure 10% 1 Teil (frisch bereiten)
Standard: 43.8 mg Kaliumdihydrogenphosphat (getr. über H_2SO_4) werden zu 100.0 ml Wasser gelöst, davon wird 1.0 ml zu 100.0 ml verdünnt; 1 ml entspricht 1 μg P.

Durchführung:

Analysen und Standard werden in Jenaer Fiolax-Gläser (mit Chromschwefelsäure, nicht mit Spülmittel gereinigt!) gegeben, mit 0.5 ml Veraschungsreagenz versetzt und zunächst 30 Min. bei 100°C, dann mindestens 90 Min. bei 180°C in einem Aluminiumblock verascht. (Bohrungen mit 45° Neigungswinkel, Tiefe 5 cm). Nach dem Veraschen müssen alle Lösungen farblos sein. Nach dem Abkühlen gibt man zu jedem Glas 5.0 ml Phosphorreagenz, mischt und läßt 2 Stdn. bei 37°C entwickeln. Die gefärbten Lösungen werden gegen einen Blindwert bei 772 nm gemessen.

Ungefähre Extinktion von 2 ml (= 2 μg P) Standard: 0.25

3.6 Uronsäurebestimmungen (nach BITTER und MUIR (57))

Reagentien:

- a) 0.025 M-di-Natriumtetraborat-10-hydrat z.A.
in konz.Schwefelsäure z.A.
- b) 0.125% Carbazol z.A. in Methanol z.A.
- c) Glucuronsäurelactonstandardlösungen von 4 - 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$
in mit Benzoesäure z.A. gesättigtem demineralisiertem Wasser

Durchführung:

5.0 ml Schwefelsäure-Reagenz (a) werden in Schliffstopfen-Reagenzgläser pipettiert, die in einem Kühlbad von 4°C stehen. Das Reagenz wird vorsichtig mit 1.0 ml Proben-, bzw. Standardlösung (c) überschichtet. Die Gläser werden ver-

schlossen und zunächst vorsichtig, dann kräftig geschüttelt. Die Temperatur sollte auf keinen Fall Raumtemperatur übersteigen. Zur Sicherheit und für extreme Genauigkeit kühlt man zweckmäßigerweise mit Aceton/Trockeneis auf -70°C .

Nach dem Mischen erhitzt man 10 Min. im siedenden Wasserbad. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur versetzt man mit 0.2 ml Carbazolreagenz (b), schüttelt um und erhitzt weitere 15 Min. im siedenden Wasserbad.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur mißt man die Extinktion bei 530 nm gegen einen gleichbehandelten Blindwert.

Für unsere Messungen lösten wir 0.5 und 1 mg BMÜ-S bzw. 1 und 2 mg BMÜ-K zu 10.0 ml in benzoessäuregesättigtem Wasser.

Je 2 Proben bestimmten wir je 8mal.

Ergebnisse:

	n	$\bar{x}$ %	s %	VK %
BMÜ-S (1)	8	24.41	0.781	3.2
BMÜ-S (2)	8	26.93	1.184	4.4
BMÜ-K (1)	8	13.24	1.123	8.5
BMÜ-K (2)	8	13.72	0.957	7.0

3.7 Proteinbestimmung nach LOWRY (59)

Reagentien:

1. Natriumcarbonatlösung 10%ig:

5.0 g Natriumcarbonat krist. z.A. zu 50.0 in dest.Wasser lösen.

2. Kupfersulfatlösung 0.1%ig:

100 mg Kupfersulfat z.A. in 100.0 ml dest.Wasser lösen.

3. Phenolreagenz 1 : 3 verdünnt:

2.0 ml Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu (Merck Art.-Nr. 9001) mit 4.0 ml dest.Wasser mischen.

4. Eiweiß-Standard-Lösung (6.0 g Eiweiß/100 ml)

Biochemica Boehringer, Mannheim

100 µl Eiweiß-Standard-Lösung werden zu 10.0 ml mit dest. Wasser verdünnt.

Durchführung:

10 - 30 mg Substanz werden zu 10.0 ml in dest. Wasser gelöst (= Analysenprobe).

Für die Analysenprobe, den Standardvergleich und die Blindprobe werden nacheinander jeweils in ein Reagenzglas pipettiert:

1.0 ml Analysenprobe	<u>bzw.</u>	
1.0 ml verdünnte Eiweiß-Standard-Lösung		<u>bzw.</u>
1.0 ml dest. Wasser		
7.0 ml Natriumcarbonatlösung und		
1.0 ml Kupfersulfatlösung.		

Man schüttelt die Proben 10 Sek. am Whirlimix und läßt 30 Min. stehen.

Dann wird pro Reagenzglas 1.0 ml Phenolreagenz (1:3 verdünnt) hinzugefügt, 10 Sek. am Whirlimix geschüttelt und 5 Min. im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Schließlich läßt man 15 Min. bei Raumtemperatur abkühlen. Anschließend wird die Extinktion der Analysenprobe bzw. der Standardlösung gegen die Blindprobe in 1 cm-Küvetten bei 578 nm gemessen.

3.8 Isoelektrische Fokussierung, Proteinfärbung

Geräte:

DESAGA Netzanschlußgerät 1200/200

DESAGA Doppelkammer für dünn-schicht-isoelektrische Fokussierung.

Trärgel:

Polyacrylamid 7% + Servalyt AG 2 - 11 (S_{erva}, Art.-Nr.42900)

Trennspannung:

200 V	30 min
400 V	150 min
800 V	120 min

Färbung:

Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Serva Art.-Nr. 17524)

0.04% in Methanol-Wasser-Essigsäure (50:50:10),

Auswaschen mit Methanol-Wasser-Essigsäure (33:66:10)

3.9 Berechnung des Molekulargewichtes der Proteinfraction aus
Sabalkernen

Grundlage der Berechnung ist die Aufstellung von Eichgeraden der Logarithmen der Molekulargewichte von Proteinen nach Elution über Sephadexgele durch DETERMANN und MICHEL (51).

Das Elutionsverhalten der Proteinfraction wurde mit Sephadex G 50 fine, sowie mit Sephadex G 100 bestimmt.

Berechnung nach folgenden Formeln:

für G-50: $\lg M = 5.415 - 0.864 (V_e/V_o)$

für G-100: $\lg M = 5.941 - 0.847 (V_e/V_o)$

Säule	V_e (ml)	V_o (ml)	$\lg M$	M
G 100	754	317	3.9264	8 400
G 51	54.8	33.9	4.0183	10 400
G 52	56.1	33.9	3.9850	9 700
G 53	54.4	33.9	4.0285	10 700
G 54	58.0	33.9	3.9367	8 600
G 55	49.4	33.0	4.1216	13 200
G 56	55.0	33.0	3.9750	9 400
G 57	48.0	29.3	3.9995	10 000
G 58	48.2	29.1	3.9839	9 600
G 59	47.8	28.4	3.9608	9 100
G 50	48.6	30.0	4.0153	10 400

$\overline{MG} = 9950$

$s = 1\ 300$

$VK = 13\%$

3.10 Aminosäureanalysen

202 g Droge wurden in 115 g Schalen- und 87 g Kernanteil getrennt, gemahlen und am Soxhlet mit Äther entfettet. Nach dem Abdunsten des Äthers extrahierten wir die Drogenrückstände 2mal mit 200 ml Wasser auf dem siedenden Wasserbad.

Die Wasserextrakte wurden auf weniger als 250 ml eingeeengt, in 250 ml Meßkolben transferiert und zu 250.0 ml aufgefüllt.

Vom Schalenextrakt wurden 100.0 ml, vom Kernextrakt 90.0 ml, auf jeweils 30 g Amberlite IR 120 (H^+ -Form, Serva Art.-Nr. 40300) aufgetragen und mit jeweils ca. 500 ml Wasser nachgewaschen, bis das Eluat völlig farblos war. Anschließend wurden die Aminosäuren mit ca. jeweils 300 ml 1-N-NH₃ bis zur negativen Ninhydrin-Reaktion desorbiert und die Lösungen bei unter 40°C zur Trockene eingeeengt und gewogen.

Vom Trockenrückstand wurden 0.25 mg für die qualitative und quantitative Aminosäureanalyse am Technikon TSM Aminosäureanalysator (Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) verwendet.

Zur Bestimmung der gebundenen Aminosäuren wurden die Proteinfractionen, sowie die Substanzen K 1 und K 1 d zunächst in einer Ampulle 18 Stdn. bei 100°C in 6-N-Salzsäure hydrolysiert.

3.11 Citrat-Bestimmung

Die nach 3.10 bereiteten Wasserextrakte wurden direkt und nach Verdünnen (1:1 und 1:5) zur enzymatischen Citratbestimmung verwendet.

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte nach der Vorschrift Citronensäure in: Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik 76/77, Boehringer, Mannheim, mit Originalenzymen von Boehringer.

3.12 Neutralzuckeranalysen

10 - 30 mg Substanz wurden in 5 - 10 ml 1-N-Trifluoressigsäure 3 Stdn., bzw. in 2-N-Trifluoressigsäure 1 Stde. auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluß hydrolysiert. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure unter mehrmaligem Zusatz von Methanol am Rotationsverdampfer vollständig entfernt.

Die Hydrolysate wurden am Biotronik ZA 5100 Zuckeranalysator am Institut für Holzforschung der Universität München qualitativ und quantitativ analysiert.

Die gleichen Hydrolysate wurden zur DC der Zucker und Uronsäuren, sowie der Aminosucker verwendet.

Adsorbentien: Cellulose-Fertigfolien und Kieselgel-Fertigplatten, Merck

Fließmittel: Isopropanol-Pyridin-Wasser (6:2:2)

Detektion: Anilinphthalat-Reagenz (34)

Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz (34)

Morgan-Elsons-Reagenz (34)

4.0 Trypsin-Inhibitor-Test (119,120)

Die Messung der Trypsinaktivität erfolgt nach Inkubation des Enzyms mit dem Inhibitor.

Reagentien:

1. 0.5 M-Phosphatpuffer; pH 6.5 (3.78 g KH_2PO_4 und 5.08 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ /100 ml)
2. 1 mN-HCl
3. Trypsinlösung (10 mg Trypsin/20 ml 1mN-HCl (2))
4. 0.1 M-Phosphatpuffer; pH 7.0 (530 mg KH_2PO_4 und 1.392 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ /100 ml)
5. 66.7 mM-Phosphatpuffer (66.7 ml Phosphatpuffer (4) werden mit 33.3 ml bidest.Wasser verdünnt).

6. 0.25 mM-N-Benzoyl-L-argininäthylesterlösung (8.5 mg BAEE (Serva Art.-Nr. 14600) werden zu 100 ml in Phosphatpuffer (5) gelöst).
7. Probe (10 mg Inhibitor wurden zu 10.0 ml in 1 mN-HCl (2) gelöst).

Zur Inkubation pipettiert man in Reagenzgläser:

	Blindwert(ml)	Standard(ml)	Probe(ml)
bidest.Wasser	7.0	7.0	6.9 - 6.0
Phosphatpuffer (1)	2.0	2.0	2.0
HCl (2)	1.0	-	-
Trypsinlösung (3)	-	1.0	1.0

sorgfältig durchmischen und weiterpipettieren

Probe (7)	-	-	0.1 - 1.0
-----------	---	---	-----------

30 Min. bei 25°C inkubieren lassen. Zur Bestimmung der Trypsinaktivität jeweils 0.1 ml weiterverwenden. Direkt in Quarzküvetten pipettieren.

BAEE-Lösung (6)	2.90	2.90	2.90
Inkubationsgemisch	0.10	0.10	0.10

mischen, Extinktion bei 255 nm nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Sek. ablesen.

Berechnung:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\Delta E/\text{min} [\text{Standard}] - \Delta E/\text{min} [\text{Probe}]}{\Delta E/\text{min} [\text{Standard}]} \cdot 100$$

Ergebnisse:

	$\Delta E \cdot 1000$ nach sec					
	60	90	120	150	180	Mittelwert
Standard	10	12	10	10	10	10.4
0.1 ml BMÜ-K	11	11	11	10	9	10.4
0.2 ml BMÜ-K	13	12	12	12	11	12.0
0.4 ml BMÜ-K	12	12	12	10	10	11.4
0.6 ml BMÜ-K	10	11	11	11	9	10.4
0.7 ml BMÜ-K	11	10	11	9	10	10.2
0.8 ml BMÜ-K	12	10	11	11	11	11.0
0.9 ml BMÜ-K	10	11	10	10	9	10.0

Eine Hemmung der Enzymaktivität war nicht zu erkennen. Bildet man aus den Mittelwerten der ΔE -Werte der einzelnen Konzentrationen erneut den Mittelwert und setzt ihn in die Rechnung ein, ergibt sich sogar eine Steigerung der Enzymaktivität:

$$\frac{10.4 - 10.77}{10.4} \cdot 100 = -3.55\%$$

5.0 Pharmakologische Teste

Die pharmakologischen Teste wurden von der pharmakologischen Abteilung der Fa. Madaus, Köln-Merheim, unter der Leitung von Professor Dr.G.Vogel, durchgeführt.

Versuchstiere

Versuchstiere waren für den Kunststoffpellet- und die Pfortenteste weibl. Wistar-Ratten, für den Granulombeutel-Test weibl. Sprague-Dawley-Ratten, Lieferfirma für beide: Mus rattus A.G., Brunnthal. Das Gewicht der Ratten lag zu Versuchsbeginn zwischen 126 g und 249 g.

Die Ratten erhielten ssniff^R-Futter (Intermast,Soest) und Wasser ad libitum.

Prüfsubstanzen

Die zu testenden Substanzen wurden in Natriumphosphatpuffer (pH 7.2 - 7.4) gelöst. Dosierung in mg/5 ml/kg i.v..

Methodik

5.1 Viscarin-Carrageenin-Ödem in der Versuchsanordnung nach GROSSKINSKY und STÜRMER (145)

Alle Ratten erhielten 0.1 ml einer 0.6%igen Viscarin-Carrageenin-Lösung intraplanar injiziert. 1 1/2 Std. vor der Provokation erhielten die Versuchsratten die jeweiligen Sabal serrulata-Chargen, die Kontrollratten das Lösungsmittel 1 x i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Ödemmessungen wurden 3, 5 und 24 Std. nach Provokation vorgenommen. Die mittleren Ödemvolumina von Versuchs- und Kontrollratten wurden miteinander verglichen.

5.2 Stauungsödem in der Versuchsanordnung nach VOGEL (137)

Die Stauungsödeme wurden provoziert, indem die rechten Hinterpfoten mit einem Wollfaden 20 Min. lang umschnürt wurden. Die Behandlungen geschahen entweder 1 1/2 vor und 24 und 48 Std. nach Provokation (0.1 mg/kg BMÜ-K) oder 1 1/2 und 24 Std. nach Provokation (0.5 mg/kg BMÜ-K) intravenös in die Schwanzvene. Die Meßzeiten der Ödeme lagen dementsprechend bei 3, 5, 24 und 48 oder nur 3, 5 und 24 Std. nach Ödemprovokation. Die Kontrollen erhielten lediglich das Lösungsmittel.

5.3 Kunststoffpellet-Test in der Versuchsanordnung nach VOGEL et al. (146)

Ein Polyurethan-Pellet wurde unter die Rückenhaut der Ratten implantiert. 1 1/2 Std. vor der Implantation wurde entweder BMÜ-K oder das Lösungsmittel 1mal i.v. in die Schwanzvene injiziert. 2 Std. nach der Implantation wurden die Pellets entnommen und ihre mittleren Gewichte/Gruppe miteinander verglichen.

Testung nach peroraler Applikation

Behandlung: 10 mg BMÜ-K/5 ml Aqua bidest./kg 3x p.o. =
21 Std., 4 Std. und 1 Stde. vor Implantation.
Kontrollen: Aqua bidest. 5 ml/kg 3x p.o. $\hat{=}$ BMÜ-K; pos.Kon-
trollen: 1 mg BMÜ-K/5 ml/Na-Phosphatpuffer/kg
1x i.v. 1 1/2 Std. vor Implantation.
2 Std. nach Implantation wurden die Ratten in
Äther pro narkosi sakrifiziert und die Pellets
entnommen.

5.4 Granulombeutel-Test in der Versuchsanordnung nach VOGEL (137)

1.0 ml einer 1.5%igen Lösung von Crotonöl in Olivenöl wurde
den Ratten s.c. in einen 25 ml großen Luftbeutel injiziert.

BMÜ-K bzw. Hydrocortison^{*)} wurde den Versuchsratten 10x i.v.
in 11 Tagen in die Schwanzvene injiziert. Am 11. Versuchstag
wurden die Ratten getötet. Die Beutelbeschaffenheit wurde
beurteilt und ihre Feucht- und Trockengewichte ermittelt.

*) Hydrocortison^R Hoechst zur Infusion.
Die Originalampullen wurden mit 50%igem Äthanol auf eine
Verdünnung von 5 mg/5 ml gebracht.
Dosierung: 5 mg/5 ml/kg 10x i.v.

5.5 Zusammenfassung der pharmakologischen Daten der wichtigsten

getesteten Sabalfractionen

Substanz	Testmodell	geprüfte Dosen mg/kg i.v.	Wirkung %	
<u>Schalenfraktionen</u>				
S 20 UÜ	Carrageenin- Ödem	0.3; 3.0	22 - 63	
S 20 (kontaminiert)		0.3; 3.0	28 - 42	
Agarose- säule	1.Fraktion	0.3; 3.0	18 - 74	
	3.Fraktion	0.3; 3.0	0 - 48	
BMÜ-S	Carrageenin- Ödem	0.1; 0.5; 1.0	25 - 62	
<u>Kernfraktionen</u>				
K 15	Carrageenin- Ödem	0.3; 1.0; 3.0; 10	0 - 58	
K 1		0.3; 1.0; 3.0; 10	44 - 73	
K 2		0.3; 1.0; 3.0; 10	75 - 81	
K 1 d		0.3; 1.0; 3.0; 10	41 - 84	
G 511		0.3; 3.0	74 - 82	
K 20 UÜ	Carrageenin- Ödem	0.3; 3.0	0 - 64	
Sephadex-G 100- Säule		1.Fraktion 2.Fraktion 3.Fraktion	0.3; 3.0	26 - 81
			0.3; 3.0	0
			0.3; 3.0	19 - 61
BMF-K		0.3; 3.0	0	
K 20 UÜ enzym.verdaut davon Trennung über Sephadex G 50	Carrageenin- Ödem	1.0	56 - 74	
1.Fraktion		1.0	68 - 76	
2.Fraktion		1.0	12 - 25	
BMÜ-K	Carrageenin- Ödem	0.1; 0.5; 1.0	74 - 87	
BMÜ-K	Stauungsödem	a) 3 x 0.1	35	
		b) 1 x 0.5	20	
BMÜ-K	Granulom- beutel	10 x in 11 Tg. 0.5	0	
BMÜ-K	Kunststoff- pellet	0.5; 1.0	55 - 58	
BMÜ-K	Kunststoff- pellet	a) 1.0 i.v.	34	
		b) 3 x 10 mg p.o.	0	
<u>zum Vergleich</u>				
Xylan "Roth"	Carrageenin- Ödem	0.3; 3.0	0	
Galactomannan		0.3; 3.0	0 - 12	

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) H.SCHINDLER, Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Stoffe, Editio Cantor, Aulendorf (1955), S. 171
- 2) E.STRASBURGER, Lehrbuch der Botanik, Fischer-Verlag, Stuttgart (1958), S. 608
- 3) J.B.READ, Amer.J.Pharmacy Sci.support publ.Health, 51, 169 (1879); zit. bei HEGNAUER (25)
- 4) E.GILDEMEISTER u. F.HOFFMANN, Die ätherischen Öle, Bd. IV, Akademie-Verlag, Berlin (1956), S. 429
- 5) I.COBLENZ, Proc.New Jersey Pharmac.Assoc. (1895), S. 63; zit. bei SCHINDLER (1)
- 6) L.SHERRARD, zit. bei SCHREINER (8)
- 7) P.L.SHERMAN u. C.BRIGGS, Pharm.Arch. 2, 101 (1899); zit. bei SCHREINER (8)
- 8) O.SCHREINER Pharm.Rev. 18, 217 (1900); zit. bei HEGNAUER (25)
- 9) C.GRIEBEL u. E.BAMES, Zeitschr.Unters.Nahrungs- u.Genußmittel, 31, 282 (1916)
- 10) P.KLOSS, Arzneim.-Forsch., 16, 95 (1966)
- 11) R.HÄNSEL, H.RIMPLER u. G.SCHÖPFLIN, Planta med. 12, 169 - 172 (1964)
- 12) C.GRIEBEL, Dt.Apoth.Ztg. 31, 306 (1916)
- 13) D.JAUD, Diss., Kiel (1966)
- 14) R.HÄNSEL, G.SCHÖPFLIN u. H.RIMPLER, Planta med., 14, 261-265 (1966)
- 15) E.W.BASSET u. S.W.TANNENBAUM, Experientia, 14, 38 (1958)
- 16) A.M.GOODVE u. R.M.BAXTER, zit. in C.A. 53, 9358 (1959)
- 17) P.SIMONART u. A.WIAUX, zit. in C.A. 54, 4762 (1960)
- 18) A.J.WOIWOOD u. F.V.LINGGOOD, zit. in C.A. 47, 1777 (1953)
- 19) I.A.PEARL, Techn.Assoc.Pap., 42, 779 (1959) u. 44, 586 (1961)
- 20) H.A.HOPPE, Drogenkunde, 7.Aufl.Cram, De Gruyter u.Co., Hamburg (1958), S. 803
- 21) G.MADAUS, Lehrbuch der biologischen Heilpflanzen, Bd. II, Leipzig (1938), S. 2384
- 22) DHU, Deutsche Homöopathie-Union, Schwabe und Madaus KG., Homöogramm Sabal serrulata, Düsseldorf (1964)
- 23) J.MEZGER, Gesichtete homöopathische Arzneimittellehre, Bd. II, Karl F.Haug-Verlag, Ulm (1965), S.1208
- 24) H.BRAUN, Zeitschr.f.Ther., 4, 42 (1966)
- 25) R.HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. II, Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart (1963)
- 26) G.DRAGENDORFF, Die Heilpflanzen der verschiedenen Zeiten und Völker, Stuttgart (1898)
- 27) E.REHM, Hahnemannia, Heft 4, S. 70 (1967)
- 28) L.G.NICKEL, Econ.Botany, 13, 281 (1959)
- 29) M.I.ELGHAMRY u. R.HÄNSEL, Experientia, 25, 828-829 (1969)
- 30) G.L.BACH, Euromed Heft 8, S. 585 (1978)
- 31) G.VOGEL, zit. in MÜNZING (32)
- 32) H.P.MÜNZING, Diss. München (1969)
- 33) H.AUTERHOFF u. J.KNABE Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H., Stuttgart (1971), S. 465
- 34) K.G.KREBS, D.HEUSSER u. H.WIMMER in: Dünnschichtchromatographie (Herausgeber E.STAHL), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967), S. 814ff.

- 35) W.KARRER, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart (1958), S. 49-50
- 36) BEILSTEIN's Handbuch der organischen Chemie, Bd. I, 1.Erg.-Werk, Systemnr. 1-151, Springer-Verlag, Berlin (1928), S. 222
- 37) K.EGGER u. H.VOIGT, Z.Pflanzenphysiologie, 53, 64 (1965)
- 38) DAB 7 BRD, Monographie Fructose
- 39) Boehringer Mannheim, Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik 1976/77
- 40) A.MISAKI in Natural Compounds, Bd. I, herausgegeben von F.KORTE u. M.GOTO, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1976), S.173
- 41) A.G.TOWLE u. R.L.WHISTLER in Phytochemistry, Bd. I, herausgegeben von L.P.MILLER, Van Nostrand Reinhold Company New York, (1973), S. 198-248
- 42) M.C.JARVIS u. H.J.DUNCAN, Phytochemistry, 15, 171-174 (1976)
- 43) G.VOGEL, M.-L.MAREK u. R.OERTNER, Arzneim.-Forsch., 20, 699-703 (1970)
- 44) R.SEWING, in Labor-Praxis, Vogel-Verlag, Würzburg, Dez. 1978, S. 44-50
- 45) Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6.Aufl., J.R.Geigy S.A., Basel (1960), S. 275
- 46) J.HÖLZL, Methoden zur Analytik von Phospholipiden, Laborvorschrift des Instituts f.Pharm.Arzneimittellehre (1974)
- 47) B.KAKAC u. L.J.Vejdelek, Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen, Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim (1974), S. 689
- 48) P.D.LAUTERBACH, Diss.Purdue University, Lafayette, Indiana (1958), zit. in R.L.WHISTLER, Methods in Carbohydrate Chemistry, Bd. V, Academic Press New York - London (1965), S. 36
- 49) M.G.SEVAG, Biochem.Z., 273, 419 (1934)
- 50) A.E.GESSLER, C.E.BENDER u. M.C.PARKINSON, Trans.N.Y.Acad. Sci., 18, 701 (1956)
- 51) H.DETERMANN u. W.MICHEL, J.Chromatog. 25, 303-313 (1966)
- 52) D.FENGEL, M.PRZYKLENK u. G.WEGENER, Das Papier, 30, 240-243 (1976)
- 53) R.B.KESLER, Analyt.Chem. 39, 1416 (1967)
- 54) W.VOELTER u. H.BAUER, Chem.Exp.Didakt., 1, 203-206 (1975)
- 55) Z.DISCHE, Biochem.Z., 189, 77 (1927)
- 56) Z.DISCHE, J.Biol.Chem., 167, 189 (1947)
- 57) T.BITTER u. H.M.MUIR, Analyt.Biochem., 4, 330-334 (1962)
- 58) G.BÄUERLE, G.OTTERBACH, K.GIERSCHNER u. G.BAUMANN, Deutsche Lebensm.-Rundschau, 73, 281-286 (1977)
- 59) O.H.LOWRY, N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR u. R.J.RANDALL, J.biol. Chem., 193, 265-275 (1951)
- 60) A.S.GOLDBERG, E.C.MUELLER, E.EIGEN u. S.J.DESALVA, J.Pharm. Sci., 58, 938 (1969)
- 61) Analytikum, Autorenkollektiv, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1972), S. 496
- 62) A.RUDIN, J.Chem.Educ., 46, 595 (1969)
- 63) Interne Arbeitsvorschrift der Fa.Waters, Königstein
- 64) T.MURAKAMI u. K.TANAKA, Chem.Pharm.Bull, 21, 1506-1509 (1973)
- 65) G.CALDES, B.PRESCOTT, C.A.THOMAS u. P.J.BAKER, Laboratory of Microbial Immunity, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda M.D. Institutsmitteilung (1978)

- 66) E.SCHRÖDER, C.RUFER u. R.SCHMIECHEN, Arzneimittelchemie I, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1976), S. 382ff.
- 67) M.FRIMMER, Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen, F.K.Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York (1971), S. 262ff.
- 68) H.GIERTZ in Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W.FORTH, O.HENSCHLER u. W.RUMMEL, B.I. Wissenschaftsverlag Mannheim-Wien-Zürich (1975), S.143ff.
- 69) M.ROTHKOPF u. G.VOGEL, Arzneim.-Forsch., 26, 225-235 (1976)
- 70) K.C.NICOLAOU, G.P.GASIC u. W.E.BARNETTE, Angew.Chem. 90, 360-379 (1978)
- 71) E.MISGELD u. H.SCHULTZ-EHRENBURG, Med.Klin. 68, 693-697 (1973)
- 72) H.BARTELS in Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie, herausgegeben von W.D.KEIDEL, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1975)
- 73) F.P.NIJKAMP, R.J.FLOWER, S.MONCADA u. J.R.VANE, Nature, 263, 479-482 (1976)
- 74) A.W.FORD-HUTCHINSON, D.E.MACINTYRE, J.Pharm.Pharmac., 30, 527-528 (1978)
- 75) C.H.WEISCHER, Arch.exp.Veterinärmed., 29, 769-776 (1975)
- 76) F.NEUMANN u. B.SCHENK in Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W.FORTH, D.HENSCHLER u. W.RUMMEL, B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim-Wien-Zürich (1975), S. 304ff.
- 77) J.R.VANE, Nature New Biology, 231, 232-235 (1971)
- 78) G.ENGELHARDT, Arzneim.-Forsch., 28, 1714-1723 (1978)
- 79) B.UNTERHALT, Pharm.Ztg., 121, 1660-1668 (1976)
- 80) H.MÖHRLE, Dt.Apoth.Ztg., 118, 1499-1509 (1978)
- 81) P.S.BENOIT, H.H.S.FONG, G.H.SVOBODA u. N.R.FARNSWORTH, Lloydia, 39, 160-171 (1976)
- 82) A.BEAUNE, Therapie, 21, 341 (1966)
- 83) G.MADAUS, Lehrbuch der Biologischen Heilmittel, Bd. I, Georg Thieme-Verlag, Leipzig (1938)
- 84) E.STEINEGGER u. R.HÄNSEL, Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
- 85) D.LORENZ u. M.-L.MAREK, Arzneim.-Forsch., 10, 263-272 (1960)
- 86) P.PATT u. W.WINKLER, Arzneim.-Forsch., 10, 273-275 (1960)
- 87) G.VOGEL u. H.UEBEL, Arzneim.-Forsch., 10, 275-280 (1960)
- 88) H.UEBEL u. P.PATT, Arzneim.-Forsch., 10, 280-284 (1960)
- 89) H.-J.JACKER, Zbl.Pharm., 116, 959-968 (1977)
- 90) H.-J.JACKER u. K.HILLER Pharmazie, 31, 747-748 (1976)
- 91) G.VOGEL, M.-L.MAREK u. R.OERTNER, Arzneim.-Forsch., 18, 1466-1467 (1968)
- 92) P.LALOUETTE, R.RICHOU u. H.RICHOU, C.R.Ser.D, 265, 582-584 (1967)
- 93) H.SHIMENO, S.SOEDA u. A.NAGAMATSU, Chem.Pharm.Bull, 25, 2983-2987 (1977)
- 94) M.GABOR, Abriß der Pharmakologie von Flavonoiden, Akademiai Kiado, Budapest (1975)
- 95) H.HIKINO, T.TAGUCHI, H.FUJIMURA u. Y.HIRAMATSU, Planta medica, 31, 214-220 (1977)
- 96) D.LORENZ, Arch.Exper.Path.Pharm., 241, 516 (1961)
- 97) R.DOMENJOZ, W.THEOBALD u. K.MÖRSDORF, Arzneim.-Forsch., 5, 488 (1955)
- 98) C.LADEN, Americ.J.Physiol., 195, 712 (1958)
- 99) O.BÜCH u. T.WAGNER-JAUREGG, Arzneim.-Forsch., 10, 834 (1960)
- 100) V.JAKOVLEV u. A. VON SCHLICHTEGROLL, Arzneim.-Forsch., 19, 615-616 (1969)

- 101) K.THIEMER, R.STADLER u. O.ISAAC, *Arzneim.-Forsch.*, 23, 756-759 (1973)
- 102) L.DEMLING, T.NASEMANN u. W.RÖSCH, *Erfahrungstherapie - späte Rechtfertigung*, Internat.Symp.Wien (1975)
- 103) J.LENFELD, M.KROUTIL u. J.ZEMANEK, *Arch.int.Pharmacodyn.* 125, 137 (1960)
- 104) A.MUGLER, *Path.Biol.*, Paris, 8, 2015 (1960)
- 105) J.F.EMELE, J.SHANAMAN u. M.M.WINBURY, *Arch.int.Pharmacodyn.* 159, 126 (1966)
- 106) G.J.MARTIN, *Internat.Symp.Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*, Mailand (1964)
- 107) Y.CAVLAK, *Münch.med.Wschr.*, 120, 1313 (1978)
- 108) R.VOGEL, I.TRAUTSCHOLD u. E.WEHRLE, *Natural Proteinase Inhibitors*, Academic Press, New York-London (1968)
- 109) E.SCHMIDT u. W.SCHWARZENDORFER, *Pharmazie in unserer Zeit*, 6, 31-41 (1977)
- 110) J.R.MÖSE, *Arzneim.-Forsch.*, 24, 151 (1974)
- 111) H.BARTFELD, *Arzneim.-Forsch.*, 27, 2297 (1977)
- 112) R.BENIGNI, C.CAPRA u. P.E.CATTORINI, *Piante medicinali*, Bd.II, Inverni Della Beffa, Mailand (1964)
- 113) B.MAJOIE, zit. in C.A., 82, 342 (1975)
- 114) H.J.MEYER, *Klin.Wschr.*, 34, 469 (1965)
- 115) E.R.HAMMARLUND, *J.Pharmac.Sci.*, 52, 204 (1963)
- 116) C.-L.CHENG, Chi-Juan Chao Yaa Hsueh Hsueh Pao, 11, 762 (1964)
- 117) E.MICHAHELLES, *Diss. München* (1974)
- 118) K.SAEKI, K.ENDO, K.TASAKA u. H.YAMASAKI, *Japan.J.Pharmacol.*, 24, 109-118 (1974)
- 119) H.U.BERGMEYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2.erweiterte Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1973), S. 814
- 120) *Biochemica Information I*, Boehringer Mannheim GmbH (1973)
- 121) C.A.WINTER, E.A.RISLEY u. G.W.NUSS, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 111, 544 (1962)
- 122) C.A.WINTER, E.A.RISLEY u. G.W.NUSS, *J.Pharmac.Exp.Ther.*, 141, 369 (1963)
- 123) F.CAPASSO, B.BALESTRIERI, M.DI ROSA, P.PERSICO u. L.SORRENTINO, *Agents and Actions*, Bd.V, Birkhäuser-Verlag, Basel (1975)
- 124) H.-J.JACKER u. J.RICHTER, *Die Pharmazie*, 30, 489-492 (1975)
- 125) G.WILHELMI u. R.DOMENJOZ, *Arzneim.-Forsch.*, 1, 151 (1951)
- 126) M.DI ROSA, J.P.GIROUD u. A.D.WILOUGHBY, *J.Path.*, 104, 15-29 (1971)
- 127) K.MILITZER, *Arzneim.-Forsch.*, 25, 1884-1889 (1975)
- 128) A.L.WILLIS, zit. bei DI ROSA (126)
- 129) N.S.DOHERTY u. B.V.ROBINSON, *J.Pharm.Pharmac.*, 27, 701-703 (1975)
- 130) J.NOORDHOEK u. I.L.BONTA, *Arch.int.Pharmacodyn.*, 206, 394-396 (1973)
- 131) R.HIRSCHELMANN, H.BEKEMEIER, J.METZNER, A.-J.GIESSLER u. A.STELZNER, *Acta biol.med. germ.*, 34, 1397-1406 (1975)
- 132) R.E.ANDERSON, P.J.WARNE u. G.B.WEST, *Int.Arch.Allergy appl. Immun.*, 52, 425-427 (1976)
- 133) I.L.BONTA, H.BULT, J.E.VINCENT u. F.J.ZIJLSTRA, *J.Pharm. Pharmac.*, 29, 1-7 (1977)
- 134) W.TSUKUDA, M.TSUBOKAWA, T.MASUKAWA, H.KOJIMA u. A.KASAHARA, *Arzneim.-Forsch.*, 28, 428-438 (1978)
- 135) G.VOGEL, *Fa.Madaus*, Köln, pers.Mitteilung

- 136) K.A.PITTMAN, L.GOLBERG u. F.COULSTON, Fd.Cosmet.Toxicol., 14, 85-93 (1976)
- 137) G.VOGEL u. M.ROTHKOPF, Fa.Madaus, Köln, pers.Mitteilung
- 138) P.PRESZIOSI u. P.MANCA,Arzneim.-Forsch., 15, 404 (1965)
- 139) F.C.ARNTZEN u. K.BRISEID, Acta pharmacol. et toxicol., 32, 179-192 (1973)
- 140) I.WITT, L.SVENDSEN, H.KOEPPEN u. K.HASLER, Fresenius Z.Anal. Chem., 290, 104-105 (1978)
- 141) C.KLUFT, VI.th International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Philadelphia (1977)
- 142) J.P.GIROUD u. J.TIMSIT, Therapie, 28, 889-905 (1973)
- 143) M.ESCHENBRUCH, Dt.Apoth.Ztg., 118, 434 (1978)
- 144) W.SCHWARTZKOPFF u. H.-J.JANTKE, Münch.med.Wschr., 120, 1575 (1978)
- 145) L.GROSSKINSKY u.E.STÜRMER, Z.ges.exp.Med., 118, 415-418 (1952)
- 146) G.VOGEL, M.-L.MAREK u.R.OERTNER, Arzneimittel.-Forsch., 18, 426-429 (1968)

L E B E N S L A U F

Geburtstag:	7.11.1949
Geburtsort:	Freienbessingen/Thüringen
Eltern:	Erhard Flachsbarth, Landwirt Elfriede Flachsbarth geb. Dünnebeil
1956 - 1968	Schulausbildung
Juni 1968	Abitur am Schubart-Gymnasium, Ulm
1968 - 1970	Praktikum in der Oberen Apotheke, Dr. D. Jaud, Günzburg
September 1970	Pharm.Vorexamen in Augsburg
Sommer-Semester 1971 - Winter-Semester 1973/74	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 1974	Pharmazeutisches Staatsexamen, Approbation als Apotheker
Juni 1974	Beginn der vorliegenden Arbeit unter Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
seit November 1974	Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am obigen Institut

